

Departement für Kleintiere, Abteilung Radio-Onkologie
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

Direktor: Prof. Dr. Jean-Michel Hatt

Arbeit unter Leitung von Dr. Natalie Hofer-Inteeworn
und
PD Dr. Carla Rohrer Bley

**Verträglichkeit und Wirksamkeit eines neuen metronomischen
Chemotherapieprotokolles beim Hund und Messung zirkulierender
endothelialer Zellen im Blut**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

Sabina Tamara Bondolfi

Tierärztin
von Poschiavo GR

genehmigt auf Antrag von

PD Dr. Carla Rohrer Bley, Referentin

Prof. Dr. Johannes Vogel, Korreferent

Zürich 2012

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	5
2. Summary	6
3. Einleitung	7
3.1. Metronomische Chemotherapie	7
3.1.1 Konzept/Definition	7
3.1.2 Wirkungsweise	8
3.1.3 Medikamente	10
3.1.4 Anwendungsgebiete und Protokolle.....	13
3.1.5 Nebenwirkungen und Verträglichkeit	16
3.2 Zirkulierende endotheliale Zellen	17
3.2.1 Konzept/Definition	17
3.2.2 Zirkulierende endotheliale Zellen und Tumorerkrankungen.....	19
3.2.3 Zirkulierende endotheliale Zellen und metronomische Chemotherapie	21
3.2.4 Messmethoden/-techniken	23
3.3 Zielsetzungen	28
4. Material und Methoden	29
4.1 Teil A: Metronomische Chemotherapie in klinischer Anwendung.....	29
4.2 Teil B: Protokoll zur Messung zirkulierender endothelialer Zellen beim Hund	31
5. Resultate	35
5.1 Teil A: Metronomische Chemotherapie in klinischer Anwendung.....	35
5.2 Teil B: Protokoll zur Messung zirkulierender endothelialer Zellen beim Hund	39
6. Diskussion	43
6.1 Teil A: Metronomische Chemotherapie in klinischer Anwendung.....	43
6.2 Teil B: Protokoll zur Messung zirkulierender endothelialer Zellen beim Hund	51
7. Literaturverzeichnis.....	55
8. Anhang	63
9. Danksagung und Widmung.....	69
10. Lebenslauf	70

Abkürzungen

MTD:	Maximal tolerierte Dosis
VEGF:	Vascular endothelial growth factor
TSP-1:	Thrombospondin 1
Treg:	Regulatorische T-Zellen
CEP:	Circulating endothelial progenitor, zirkulierende endotheliale Vorläuferzelle
CEC:	Circulating endothelial cell, zirkulierende endotheliale Zelle
GITR:	Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family-related gene
FoxP3:	Forkhead box P3
DFI:	Disease free interval, krankheitsfreies Intervall
IL-6:	Interleukin-6
PR:	Partial remission, partielle Remission
SD:	Stable disease, stabile Erkrankung
UEA-1:	Ulex europaeus agglutinin
NSAIA:	Nonsteroidal anti-inflammatory agents, nichtsteroidale Entzündungshemmer
SID:	Single in a day, jeden Tag
EOD:	Every other day, jeden zweiten Tag
TCC:	Transitional Cell Carcinoma, Übergangsepithelkarzinom
HSA:	Hämangiosarkom
OSA:	Osteosarkom
Chx:	Chirurgie
PBS:	Phosphate buffered saline
MNZ:	Mononukleäre Zellen

1. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die Verträglichkeit und Wirksamkeit eines neuen metronomischen Chemotherapieprotokolles beim Hund zu untersuchen sowie ein Protokoll zur Messung zirkulierender endothelialer Zellen beim Hund zu etablieren.

Hunde mit Spontantumoren wurden mit Cyclophosphamid, Thalidomid und einem NSAIA behandelt, welche in kurzen Abständen peroral verabreicht wurden. Aufgrund der niedrigen Dosierung wurden keine oder nur milde Nebenwirkungen erwartet. Bei 36 behandelten Hunden konnten Verträglichkeit, Ansprechen auf Therapie, progressionsfreie Zeit und Überlebenszeit evaluiert werden. Die Verträglichkeit des verwendeten Protokolles war sehr gut. Insgesamt wurden nur milde Nebenwirkungen beobachtet und das Ansprechen auf die Therapie ist als vielversprechend zu werten.

Da in der Humanmedizin gezeigt wurde, dass zirkulierende Endothelzellen bei Krebspatienten erhöht sind und durch die metronomische Chemotherapie beeinflusst werden, könnte die Messung auch in der Veterinärmedizin als Marker für das Ansprechen auf die Therapie herangezogen werden.

Ein Protokoll zur Messung kaniner reifer zirkulierender endothelialer Zellen sowie deren Vorläuferzellen wurde mittels Durchflusszytometrie etabliert. Anschliessend wurden diese Zellpopulationen bei gesunden und an Tumoren erkrankten Hunden gemessen. Kranke Hunde zeigten signifikant höhere Werte an reifen zirkulierenden Endothelzellen, bei den Vorläuferzellen wurde kein signifikanter Unterschied gesehen.

2. Summary

The present study evaluated tolerance and efficacy of a new metronomic chemotherapy protocol in dogs. In addition, a new protocol to measure circulating endothelial cells in canine blood was established.

Metronomic chemotherapy is based on frequent, low-dosed drug administrations over a long period of time. Severe side-effects are not expected and are commonly rare. Our protocol used a combination of cyclophosphamide, thalidomide and a nonsteroidal-antiinflammatory drug. Thirty-six dogs under metronomic therapy were included in the study. Tolerance, efficacy, progression free interval and overall survival were analysed. The combination of drugs was well tolerated, side effects were mild and efficacy is promising.

It has been shown that circulating endothelial cells are elevated in the blood of human cancer patients. Those cells are affected by metronomic chemotherapy and thus can be used as marker for response to treatment.

Therefore, a protocol for measurement of canine circulating mature and progenitor endothelial cells by flow cytometry was established. In a subsequent pilot study, circulating endothelial cells were measured in healthy and tumor-bearing dogs. It could be shown that tumor-bearing dogs had significantly elevated numbers of mature circulating endothelial cells, while there was no difference in the progenitor cell count.

3. Einleitung

3.1. Metronomische Chemotherapie

3.1.1 Konzept/Definition

Der Begriff metronomische Chemotherapie wurde im Jahre 2000 erstmals erwähnt [1]. Bei der metronomischen Chemotherapie werden zytotoxische Substanzen in niedrigen Dosierungen in kurzen Abständen über längere Zeiträume meist peroral verabreicht. Dieser Einsatz der Medikamente steht im Gegensatz zur maximal tolerierten Dosis (MTD) Chemotherapie, bei welcher die Medikamente in sehr hohen Dosen jedoch in grösseren Abständen verabreicht werden. Der Begriff metronomisch leitet sich vom Metronom aus der Musik ab, welches einen regelmässigen, gleichbleibenden Takt angibt. Andere Namen für diese Art von Therapie sind „niedrig-dosierte Chemotherapie“ oder „antiangiogene Chemotherapie“. Zusätzlich zu der zytotoxischen Substanz wie z. B. Cyclophosphamid, Etoposid, Methotrexat und Chlorambucil, werden in vielen Fällen ein nicht-steroidaler Entzündungshemmer und in einigen Studien auch ein Immunmodulator wie Thalidomid verabreicht [2-4]. Die bei der herkömmlichen MTD Chemotherapie nötigen Pausen zwischen den Chemotherapeutikagaben entfallen. Grund für die Pausen bei der MTD-Verabreichung ist die notwendige Regeneration der gesunden Gewebe wie Magen-Darmgewebe und Knochenmark, welche durch die Chemotherapie ebenfalls geschädigt werden. Da diese Gewebe durch die metronomische Chemotherapie nur leicht geschädigt werden, sind Pausen in dieser Art von Therapie nicht nötig.

In den letzten Jahren fand die metronomische Chemotherapie auch in der Veterinärmedizin immer mehr Beachtung, nicht zuletzt wegen der im Allgemeinen guten Verträglichkeit, den geringen Kosten und der einfachen Verabreichung.

In einer der ersten Studien zur metronomischen Chemotherapie wurde in Mausmodellen für Neuroblastom ein therapeutischer Nutzen metronomisch verabreichten Vinblastins in Kombination mit vascular endothelial growth factor Rezeptor-2 Antikörper (VEGFR2) gezeigt. Diese Kombinationstherapie führte im Vergleich zur Therapie mit nur einer Substanz zu kompletter Tumorregression, verminderter Vaskularität im Tumor und Hemmung der Tumorangiogenese [5].

In einer weiteren Studie wurde an Mausmodellen für resistentes Lewis-Lungenkarzinom die Wirkung von metronomisch verabreichtem Cyclophosphamid untersucht. Unter der metronomischen Therapie konnte eine Tumorkontrolle ohne Tumorwachstum für 36 Tage und danach sehr langsames Wachstum beobachtet werden, im Gegensatz dazu war die Tumorkontrolle unter MTD-Therapie mit 13 Tagen von deutlich kürzerer Dauer [6].

3.1.2 Wirkungsweise

Bei der herkömmlichen MTD-Chemotherapie werden maximal hohe Dosen an zytotoxischen Substanzen verabreicht. Ziel ist es, so viel Chemotherapeutikum wie möglich zu verabreichen, um weitestgehend viele Tumorzellen zu zerstören, gleichzeitig jedoch die Toxizität im gesunden Gewebe nach Möglichkeit zu limitieren. Damit das gesunde Gewebe die Gelegenheit hat sich zu regenerieren, ist es notwendig zwischen den einzelnen Chemotherapeutika-Applikationen längere Pausen einzuschalten. Die Wirkungsweise der metronomischen Chemotherapie ist noch nicht in vollem Umfang geklärt. Es werden verschiedene Wirkmechanismen diskutiert und zum Teil auch nachgewiesen, welche darauf hinweisen, dass es letztendlich zu einer Veränderung der Tumorumgebung und somit zur Störung der Interaktion zwischen Tumor und dem umgebenden Gewebe kommt. Die Veränderung des Tumormilieus beruht vermutlich vor allem auf der Hemmung der Tumorangiogenese und auf einer Modulation des Immunsystems [2-4, 7]. Durch diese Störung des Tumormilieus sollen sowohl Primärtumor wie auch Metastasen im Wachstum gehemmt werden, sodass es theoretisch zu einer dauerhaften Tumorstabilisierung oder sogar Tumorrückbildung kommen kann.

Mehrere Studien haben gezeigt, dass ein direkter antiangiogener Effekt durch die Wirkung der metronomischen Chemotherapie auf sogenannte zirkulierende endotheliale Zellen zustande kommt [8-10]. Physiologischerweise werden durch Stimuli wie z. B. sezernierte Wachstumsfaktoren sogenannte endotheliale Vorläuferzellen aus dem Knochenmark ausgeschüttet [11-13], die über die Blutbahn zu sich bildenden Blutgefäßen gelangen und dort zu reifen endothelialen Zellen ausdifferenzieren. Diese endotheliale Zellpopulation ist folglich an der Blutgefäßbildung beteiligt [14-19]. Aktivierte endotheliale Zellen reagieren sehr sensitiv und selektiv auf niedrige Dosen zytotoxischer Substanzen [20-22], es wird daher vermutet, dass die niedrig dosierten Chemotherapeutika die endothelialen Zellen in den sich bildenden Tumorgefäßen hemmen und somit indirekt die neoplastischen Zellen

geschädigt werden, die auf Nährstoff- und Sauerstoffversorgung über die Blutbahn angewiesen sind [8]. Weiter wird diskutiert ob durch die metronomische Therapie auch die Freisetzung der Vorläuferzellen aus dem Knochenmark gehemmt wird [9, 23].

Ausführlicheres zu zirkulierenden endothelialen Zellen wird im Kapitel 3.2 diskutiert.

Eine mögliche Erklärung für die Sensitivität endothelialer Zellen gegenüber der metronomischen Chemotherapie, ist die Aufregulierung von Thrombospondin 1 (TSP-1). TSP-1 ist ein potenter, endogener, endothelspezifischer Angiogeneseinhibitor, welcher eine Komponente der extrazellulären Matrix darstellt und z. T. auch ins Blut sezerniert wird. TSP-1 bindet an die CD36 Rezeptoren der endothelialen Zellen und blockiert so deren Proliferation [24]. Zudem konnte gezeigt werden, dass durch die Bindung von TSP-1 an seinen Rezeptor die Apoptose der endothelialen Zellen induziert wurde [4, 25]. Des Weiteren bindet TSP-1 den Wachstumsfaktor VEGF und hemmt so dessen pro-angiogene Wirkung. Den endothelialen Vorläuferzellen fehlt somit ein wichtiger Stimulus für Wachstum und Ausschüttung aus dem Knochenmark [26].

Es wurde gezeigt, dass nicht nur die metronomische Chemotherapie einen Einfluss auf die zirkulierenden endothelialen Zellen hat, sondern auch die MTD-Chemotherapie. Nach Gabe einer herkömmlichen Dosis an Cyclophosphamid sinkt die Zahl an zirkulierenden endothelialen Zellen, um kurz darauf aber wieder massiv anzusteigen [9, 27]. Im Gegensatz zur metronomischen Chemotherapie jedoch wird in den Pausen zwischen den einzelnen Medikamentengaben der durch die Chemotherapeutika verursachte Schaden an den Blutgefäßen des Tumors wieder repariert. Die notwendigen Pausen zur Erholung des gesunden Gewebes zwischen den Chemotherapeutikagaben und die daraus resultierende Reparatur der Blutgefäße sind ein Grund, warum die MDT-Chemotherapie nicht dauerhaft antiangiogen wirkt. Daraus ergibt sich der Vorteil der metronomischen Chemotherapie, da die kontinuierliche Gabe geringer Dosen an Chemotherapeutika über lange Zeiträume zur antiangiogenen Wirkung der metronomischen Chemotherapie führt [9].

Eine weitere vermutete Wirkung der metronomischen Chemotherapie kommt durch die Modulation des Immunsystems zustande. Dabei spielt vermutlich v. a. eine Wirkung auf sogenannte regulatorische T-Zellen (Treg) eine Rolle. Die CD4⁺CD25⁺ Tregs sind nicht nur an der Ausbildung von Immuntoleranz/Autoimmunität und Allergien beteiligt, sondern besitzen auch die Fähigkeit bei Tumorpatienten, die natürliche anti-Tumor-Antwort des Immunsystems zu unterdrücken [28]. Zum Beispiel hat eine Studie mit Nagern eine

Akkumulation der Tregs in Tumoren und Lymphknoten gezeigt, was mit Tumorprogression korrelierte [29]. Mehrere klinische Studien haben zudem gezeigt, dass bei Tumorpatienten die Zahl der Tregs erhöht sein kann. Die Zahl steigt proportional zum Tumorwachstum. Treg unterdrücken andere T-Zellen und die natürlichen Killerzellen (NK), was wiederum zur Unterdrückung der Anti-Tumor-Antwort, zu Tumorprogression und schlechterer Prognose führt [30, 31]. Auch beim Hund wurde bei verschiedenen Tumorerkrankungen eine Erhöhung der Treg beobachtet, v. a. bei Karzinomen, Osteosarkomen und Weichteilsarkomen [32-34].

In einer Studie wurde gezeigt, dass durch die metronomische Therapie mit Cyclophosphamid die Zahl der Treg nicht nur reduziert und ihre Apoptoserate erhöht wurde, sondern auch ihre Funktionsfähigkeit beeinträchtigt wurde. Des Weiteren wird die Expression von GITR (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family-related gene) und FoxP3 (forkhead box P3), welche bei der suppressiven Wirkung der Treg eine Rolle spielen, nach Cyclophosphamidgabe herunterreguliert [35]. In einer weiteren Studie wurde ebenfalls gezeigt, dass die Zahl der Tregs unter metronomischer Cyclophosphamidtherapie abnahm und dass die Tumolvaskularität durch die Therapie vermindert wurde [34].

Ein weiterer diskutierter Punkt ist der Einfluss der metronomischen Chemotherapie auf die Tumoroxygenierung. Emmenegger et al. zeigten anhand eines Mausmodells für Prostatakarzinom, dass die metronomische Therapie mit Cyclophosphamid zu reduzierter Oxygenierung des Tumors und zu reduzierter Gefäßdichte führte. In Kombination mit Tirapazamin, einem Chemotherapeutikum, dessen toxische Form durch Hypoxie aktiviert wird (hypoxic cell cytotoxin), wurde in Prostatakarzinom-, Brustkrebs- und Kolonadenokarzinommodellen eine erhöhte Tumorkontrolle erreicht [36]. Eine Studie von Doloff et al. zeigte wiederum das Gegenteil, die Tumoroxygenierung stieg unter metronomischer Cyclophosphamidtherapie an, wie auch die Aufnahme des Chemotherapeutikums in den Tumor [37].

3.1.3 Medikamente

Bei der metronomischen Chemotherapie werden oft verschiedene Medikamentengruppen kombiniert verabreicht, um den Tumor durch die Kombination der verschiedenen Wirkmechanismen der einzelnen Medikamentengruppen zu schädigen und somit eine maximale Wirkung der Therapie zu erreichen. Als Chemotherapeutikum wird in den meisten Fällen Cyclophosphamid verwendet, es kommen aber auch andere Medikamente wie z. B.

Etoposid und Methotrexat zum Einsatz [10, 38-41]. In der Tiermedizin sind die Kombination von Cyclophosphamid und einem nichtsteroidalen Entzündungshemmer [42, 43] und die Kombination von Cyclophosphamid, Etoposid und einem nichtsteroidalen Entzündungshemmer [44] beschrieben. Auch ist der Einsatz von Cyclophosphamid als alleinige Therapie beschrieben wie auch der Einsatz von Thalidomid [34, 45]. Im Folgenden werden die Medikamente, welche bisher in der Tiermedizin verwendet wurden, diskutiert.

Cyclophosphamid gehört zu der Gruppe alkylierender Agentien, es ist ein Pro-Pharmakon, welches in der Leber zu den aktiven Formen 4-Hydroxycyclophosphamid und Aldophosphamid oxidiert wird.

Cyclophosphamid wird in Kombination mit anderen zytotoxischen Substanzen zur Therapie verschiedener Tumoren, v. a. malignen Lymphomen, verschiedenen Karzinomen und Sarkomen eingesetzt. Unter Cyclophosphamidtherapie kann es zu Nebenwirkungen wie Knochenmarkssuppression, Harnblasenirritation und steriler hämorrhagischer Zystitis kommen. Die sterile hämorrhagische Zystitis kommt durch den inaktiven Metaboliten Acrolein zustande, der in der Blase die Schleimhaut stark schädigen kann [46]. Es wurde festgestellt, dass Tumoren, welche resistent auf Cyclophosphamid in MTD-Dosierung sind, sensitiv auf metronomisch verabreichtes Cyclophosphamid reagieren [6]. Umgekehrt zeigte eine Studie, dass auf metronomisch verabreichtes Cyclophosphamid resistente Tumoren auf MTD Cyclophosphamid sensitiv reagieren [47].

Das in einer Studie über Hunde mit Hämangiosarkomen [44] verwendete Zytostatikum Etoposid ist ein halbsynthetisches Derivat von Podophyllotoxin. Es wird in der Therapie verschiedener soliden und hämatopoetischer Tumoren des Menschen eingesetzt [48]. Etoposid hemmt die Topoisomerase II, was zu einer Hemmung der Zellteilung führt. Da die Hemmung der Topoisomerase II reversibel ist, bietet es sich an, Etoposid metronomisch zu verabreichen, um kontinuierlichere Wirkspiegel zu erreichen als bei der MTD Gabe [49, 50]. Etoposid kann intravenös oder peroral verabreicht werden. Da für die orale Gabe bei Hunden die für Menschen gedachten Etoposidkapseln von der Dosierung her nicht geeignet sind, wurde bei Hunden verdünnte Injektionslösung peroral verabreicht [44, 50]. Eine Studie hat allerdings festgestellt, dass die biologische Verfügbarkeit nach oraler Administration sehr tief war und der Nutzen von oral verabreichtem Etoposid somit fraglich ist [50]. Auch in der bereits erwähnten Studie über Hunde mit Hämangiosarkomen wurde festgestellt, dass die Serumkonzentration von Etoposid nach der peroralen Gabe rasch absank und Etoposid 24 Stunden nach Gabe im Serum nicht mehr nachweisbar war [44].

Eine zweite mögliche Komponente der metronomischen Chemotherapie ist das Glutaminsäurederivat Thalidomid, es wurde in den 1950er Jahren als Schlafmittel und Antiemetikum eingesetzt. Wegen des starken teratogenen Effektes wurde Thalidomid wieder vom Markt genommen. 1994 entdeckte man die Ursache für die schweren Missbildungen in der embryonalen/fetalen Entwicklung, diese war auf die Hemmung der Blutgefäßbildung zurückzuführen [51].

Die Bildung von Blutgefäßen spielt eine wichtige Rolle im Wachstum von Tumoren, denn der Tumor muss mit Nährstoffen versorgt werden und Abfallstoffe müssen abtransportiert werden. Somit sind antiangiogen wirksame Medikamente von grossem Interesse in der Tumorthherapie. Seit der Entdeckung der antiangiogenen Wirkung wird der Nutzen von Thalidomid in der Tumorthherapie untersucht. Die Anwendung wurde bisher v. a. bei multiplem Myelom etabliert [45, 52-55]. Die Hemmung der Blutgefäßbildung kommt durch die Reduktion von angiogen wirksamen Faktoren zustande. Vermutet werden aber nicht nur eine hemmende Wirkung auf die Blutgefäßbildung des Thalidomids, sondern auch andere Antitumor-Effekte, unter anderem eine Erhöhung der Anfälligkeit auf Apoptose und Reduktion von wachstumsstimulierenden Faktoren, Stimulation des Immunsystems durch Stimulation von T-Lymphozyten, natürlicher Killerzellen und erhöhte Prädisposition zu zellulärer Immunität und Schwächung des metastatischen Potentials durch Reduktion von Adhäsionsmolekülen [56].

Die dritte Komponente der metronomischen Chemotherapie in den bisher veröffentlichten veterinärmedizinischen Studien umfasst die nichtsteroidalen Entzündungshemmer. Bei verschiedenen Tumorarten des Hundes wie z. B. dem Übergangsepithelkarzinom der Blase, renalem Karzinom, Mammakarzinom, intestinalem Karzinom, kutanem und nasalem Karzinom und einigen Sarkomen wurde eine COX-2-Überexpression festgestellt [57-60]. Dies führt zu einer vermehrten Prostaglandin-E₂-Produktion, die wiederum eine Hemmung der Apoptose in Tumorzellen, vermehrte Zellproliferation, Angiogenesestimulation und Immunsuppression bewirkt [61].

COX-2-Hemmer werden daher oft in der Therapie kaniner Tumoren mit vermuteter COX-2-Überexpression eingesetzt. Eine tatsächliche Wirkung bei Tumorerkrankungen des Hundes konnte bisher z. B. bei Prostatakarzinomen [62], bei Übergangsepithelkarzinomen in der Blase [57, 63, 64] und bei oralen Plattenepithelkarzinomen [65, 66] gezeigt werden. In der metronomischen Chemotherapie kommen aufgrund ihrer im Allgemeinen guten Verträglichkeit beim Hund v. a. Piroxicam (Pirox, Pirocam), Carprofen (Rimadyl, Canidryl) und Meloxicam (Metacox, Metacam) zum Einsatz.

3.1.4 Anwendungsgebiete und Protokolle

Die Wirkung der metronomischen Chemotherapie wurde sowohl in Nagermodellen als auch in humanmedizinischen Studien nachgewiesen [6, 10, 38, 40, 41, 67-80]. Auch in der Veterinärmedizin wurden einige wenige Studien veröffentlicht [34, 42-44, 81].

In Mausmodellen wurde die Wirkung der metronomischen Chemotherapie für verschiedene Tumorerkrankungen wie Prostatakarzinom, Brustkrebs, Melanom, Kolonkrebs und Lungenkarzinom untersucht. Die Mäuse erhielten Cyclophosphamid in einer Dosierung von 10 bis 170 mg/kg täglich über das Trinkwasser. Bei allen Tumormodellen konnte eine Hemmung des Tumorwachstums bis z. T. Tumorregression und eine Lebensverlängerung gezeigt werden [6, 67-70]. In der klinischen Forschung findet die metronomische Chemotherapie bei verschiedensten Tumorerkrankungen des Menschen Anwendung. Sie wird vor allem bei austherapierten Patienten oder bei älteren Patienten, deren Gesundheitszustand keine herkömmliche Chemotherapie zulässt, eingesetzt. In mehreren klinischen Studien über die Wirkung der metronomischen Chemotherapie bei metastasierten Mammakarzinomen und Ovarialkrebs erhielten Patientinnen 50 mg Cyclophosphamid per os einmal täglich. Die Mammakarzinompatientinnen erhielten zusätzlich 2.5 mg Methotrexat per os zweimal täglich, die Ovarialkrebspatientinnen erhielten zusätzlich zum Cyclophosphamid 10 mg/kg Bevacizumab, einen monoklonalen Antikörper gegen VEGF, der intravenös alle zwei Wochen verabreicht wurde. Ein Teil der Mammakarzinompatientinnen erhielt als dritte Therapiekomponente 200 mg Thalidomid per os einmal täglich. Bei einem Grossteil der Patientinnen konnte eine partielle Tumorregression oder eine Tumorstabilisierung erreicht werden, bei einigen Patientinnen wurde sogar eine komplette Tumorregression beobachtet. Da es sich bei allen Studienteilnehmerinnen um massiv vorbehandelte Patientinnen handelte, wurde eine Tumorstabilisation über mehrere Wochen als Therapieerfolg gewertet. Die Therapie wurde zudem als gut verträglich beschrieben. Es wurden in keiner der Studien therapielimitierende Nebenwirkungen beobachtet [10, 38, 79].

In Studien über hormonresistente Prostatakarzinome wurde Patienten 50 mg Cyclophosphamid per os einmal täglich verabreicht, z. T. in Kombination mit 200 mg Celecoxib per os zweimal täglich und 1mg Dexamethason per os einmal täglich. Die Verträglichkeit der Therapie war sehr gut, es wurden keine limitierenden Nebenwirkungen beobachtet. Auch in diesen Studien waren die Patienten bei Studienbeginn bereits massiv vorbehandelt und hatten z. T. schon Metastasen. Trotzdem wurde durch die metronomische Therapie eine Verbesserung der Erkrankung erreicht. In einer Studie betrug die mittlere

Überlebenszeit 21 Monate, in einer anderen Studie wurde eine mittlere Ansprechzeit von 7.5 Monaten beobachtet. In einer dritten Studie wurde bei über 50% der Patienten eine z. T. massive Reduktion des Prostata-spezifischen Antigens (PSA-Wert) festgestellt, was mit der Stabilisation der Erkrankung korreliert [75-77].

Die Wirkung der metronomischen Chemotherapie wurde auch bei rezidierten und resistenten Non-Hodgkin's Lymphomen untersucht. Die Patienten erhielten 50 mg Cyclophosphamid per os einmal täglich und zusätzlich 400 mg Celecoxib per os zweimal täglich. Die erreichte mittlere progressionsfreie Überlebenszeit betrug 4.7 Monate, die mittlere Überlebenszeit 14.4 Monate. Einige Patienten zeigten ein Ansprechen auf die Therapie von mehr als 9 Monaten (9.4-29 Mo). Diese Resultate wurden im Vergleich zu Resultaten anderer palliativer Chemotherapieprotokollen [82, 83] als gut bewertet [73].

Die metronomische Chemotherapie wurde bisher auch bei nicht-resezierbaren metastatischen Melanomen, inoperablen Weichteilsarkomen, rezidierten malignen Gliomen, renalen Karzinomen und fortgeschrittenen soliden Tumoren eingesetzt. Verschiedene Protokolle wurden verwendet, aber alle beinhalteten Cyclophosphamid als Hauptkomponente, zusätzlich wurden Medikamente wie Celecoxib, Etoposid, Prednisolon, Rofecoxib, Thalidomid oder Vinblastin eingesetzt. In allen Studien konnte eine positive Wirkung der metronomischen Chemotherapie nachgewiesen werden [40, 41, 71, 72, 78, 80]. Die beschriebenen Studien sind tabellarisch im Anhang aufgeführt (Anhang 1).

Bisher wurden in der Veterinärmedizin fünf Studien zur metronomischen Chemotherapie beim Hund veröffentlicht.

Bei Hunden mit durch Splenektomie operierten Hämangiosarkomen in der Milz wurde gezeigt, dass eine adjuvante metronomische Chemotherapie mit Cyclophosphamid, Etoposide und Piroxicam eine Alternative zur herkömmlich empfohlenen Chemotherapie mit Doxorubicin sein könnte. Neun Hunde erhielten täglich Etoposid in einer Dosierung von 50 mg/m² für drei Wochen im Wechsel mit Cyclophosphamid 12.5-25 mg/m² täglich für drei Wochen. Zusätzlich erhielten die Hunde täglich Piroxicam in üblicher Dosierung. Keines der Tiere zeigte hochgradige hämatologische oder gastrointestinale Nebenwirkungen. Zwei Hunde entwickelten eine sterile hämorrhagische Zystitis. Die mediane Überlebenszeit betrug 178 Tage, sie war signifikant länger als die mediane Überlebenszeit für die Hunde, die mit Doxorubicin behandelt wurden (9 Hunde, 133 Tage) [44].

In einer weiteren Studie wurde belegt, dass eine metronomische Therapie mit Cyclophosphamid und Piroxicam Tumorrezidive bei inkomplett entfernten Weichteilsarko-

men hinauszögert. Dreissig Hunde mit inkomplett exzidierten Weichteilsarkomen wurden mit 10 mg/m^2 Cyclophosphamid einmal täglich und 0.3 mg/kg Piroxicam einmal täglich behandelt. Bei inakzeptablen Nebenwirkungen wurde die Dosierung auf jeden zweiten Tag reduziert. Die meisten Hunde hatten ein Hämangioperizytom. Fünfundfünfzig Kontrollhunde erhielten keine zusätzliche Therapie zur Chirurgie. Das krankheitsfreie Intervall (DFI) der behandelten Hunde war signifikant länger als das der unbehandelten (median DFI unbehandelte 211 Tage. Das mediane DFI der behandelten Hunde wurde bis zum Abschluss der Studie nicht erreicht, betrug aber zum Zeitpunkt der Auswertung statistisch ein Minimum von 410 Tagen). 40% der Hunde entwickelten Nebenwirkungen, die aber im Allgemeinen sehr mild waren (Grad 1 und 2). Sieben Hunde zeigten Anorexie oder Erbrechen, 2 Hunde hatten erhöhte Kreatininwerte, 3 Hunde entwickelten eine sterile hämorrhagische Zystitis. Bei keinem Hund musste die Therapie wegen den Nebenwirkungen abgebrochen werden [43].

In einer kürzlich veröffentlichten Studie mit Hunden mit Weichteilsarkomen wurde die Wirkung der metronomischen Therapie mit Cyclophosphamid auf die regulatorischen T-Zellen (Tregs) und die Tumorangio-genese untersucht. Elf Hunde wurden entweder mit 12.5 oder 15 mg/m^2 Cyclophosphamid einmal täglich behandelt. An Tag 0, 14 und 28 der Therapie wurden die Treg im Blut mittels Flow Zytometrie gemessen und Biopsien der Tumoren zur Messung der Vaskularisation entnommen. 21 gesunde Hunde bildeten die Kontrollgruppe. Unter der Therapie mit 12.5 mg/m^2 Cyclophosphamid sank die Zahl der Treg signifikant, die Prozentzahl der Treg und die Tumurvaskularität blieben aber unverändert. Unter der höher dosierten Therapie mit 15 mg/m^2 Cyclophosphamid sank sowohl die absolute wie auch die relative Zahl der Treg sowie die Tumurvaskularität [34].

Eine weitere Studie befasste sich mit der Wirkung einer metronomischen Chemotherapie mit Cyclophosphamid und Celecoxib als Ersttherapie bei Hunden mit metastasierten Tumoren. 15 Hunde mit malignen Neoplasien mit Metastasen zum Zeitpunkt der Diagnose wurden mit 25 mg/m^2 Cyclophosphamid einmal täglich und 2 mg/kg Celecoxib einmal täglich behandelt. Ein Hund mit oralem malignem Melanom erreichte eine komplette Remission des Tumors und 5 Hunde erreichten stabile Erkrankung. Die mediane Überlebenszeit für alle Hunde betrug 3.39 Monate (95%CI 0.56-3.91). Bei 11 Hunden wurde VEGF und IL-6 vor Therapiebeginn gemessen (Basiswerte). Die VEGF-Werte waren bei Hunden, die auf die Therapie ansprachen, tiefer als bei den Hunden, die nicht auf die Therapie ansprachen. Bei den IL-6-Werten gab es keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen [42].

Die Wirkung von metronomisch verabreichtem Lomustin, ebenfalls einem alkylierenden Medikament, welches üblicherweise nicht in metronomischer Dosierung angewendet wird,

wurde bei 81 Hunden mit verschiedenen Tumorerkrankungen untersucht. Die Hunde wurden mit 2.84 mg/m² Lomustin per os einmal täglich behandelt und waren bereits mit MTD-Chemotherapie, Bestrahlung oder Chirurgie vorthapiert. Bei 22 Hunden musste die Therapie allerdings wegen Nebenwirkungen abgebrochen werden. Bei 64 Hunden konnte das Ansprechen auf die Therapie ausgewertet werden, davon erreichten vier (6%) eine partielle Remission (PR) des Tumors und 19 (30%) eine Tumorstabilisation (stable disease, SD). Die mediane SD dauerte 137 Tage (46-290 Tage) [81].

3.1.5 Nebenwirkungen und Verträglichkeit

Im Allgemeinen zeigen die bisher veröffentlichten Studien, dass die metronomische Chemotherapie sowohl vom Menschen wie auch vom Hund gut vertragen wird. Schwere Nebenwirkungen, die zu Dosisreduktionen oder Abbruch der Therapie zwingen, wurden selten beschrieben. In einer Studie von Buckstein et al. mit 35 Patienten mit Non-Hodgkin's Lymphom unter metronomischer Chemotherapie (low dose Cyclophosphamid, high dose Celecoxib) zeigten die Patienten kardiovaskuläre Nebenwirkungen wie Grad 1 bis 3 Hypertension (3 Patienten), tiefe Venenthrombosen (2 Patienten) und Lungenembolie (1 Patient). Bei 12 Patienten musste die Dosis reduziert werden wegen Grad 3 bis 4 Neutropenie (2 Patienten), und Thrombozytopenie (2 Patienten) oder erhöhten Leberwerten (2 Patienten, Grad 2-3 Toxizität). Die auftretenden gastrointestinalen Nebenwirkungen wie Durchfall, Erbrechen und Anorexie waren mild (Grad 1 bis 2) [73]. In einer Studie von Mir et al. wurden Anämie, Neutropenie, Thrombozytopenie und Lymphopenie beschrieben; auch hier waren die gastrointestinalen Nebenwirkungen mild [72].

Beim Hund sind milde gastrointestinale Nebenwirkungen wie Grad 1 und 2 Erbrechen, Durchfall und Anorexie beschrieben. In einer Studie von Elmslie et al. zeigten 7 von 30 Hunden milde Anorexie und Durchfall, 2 Hunde hatten erhöhte Kreatininwerte und 3 Hunde entwickelten eine sterile hämorrhagische Zystitis [43]. Bei Anzeichen für Zystitis muss die Therapie mit Cyclophosphamid unterbrochen oder abgebrochen werden. Nebenwirkungen der metronomischen Chemotherapie, welche durch das Thalidomid bedingt sind, können vorkommen, im Allgemeinen wird Thalidomid aber gut vertragen. Beim Mensch sind Nebenwirkungen wie Müdigkeit, Somnolenz, Hautreaktionen, Konstipation und periphere Neurotoxizität beschrieben. Selten kommen trockene Mundschleimhaut, Leberenzymstörun-

gen, Hypothyreose, Bradykardie und Depression vor [56]. Des Weiteren sind auch tiefe Venenthrombosen beschrieben, daher wird in der Humanmedizin die prophylaktische Verabreichung von Antikoagulantien bei Thalidomidtherapie empfohlen [84]. Beim Hund sind wenige Daten zu Toxizität durch Thalidomidanwendung bekannt. In einer Studie mit 55 Beagle Hunden, denen über 53 Wochen hohe Dosen (43, 200 oder 1000 mg/kg/Tag) von Thalidomid verabreicht wurden, wurden grün gefärbter Urin, vergrößertes und/oder blau verfärbtes Mammagewebe und verlängerte Östruszeiten beschrieben. Des Weiteren wurden dilatierte Milchgänge, glanduläre Hyperplasie und erhöhte Gallenblasenpigmente beobachtet. Beobachtete Veränderungen in Blut-hämatologie und -chemie waren erniedrigte Erythrozytenzahlen, erhöhte Alkalische Phosphatase-, Harnstoff-, Chlorid- und Natriumwerte, erniedrigte Albumin-, Kalzium-, Kalium- und Bilirubinwerte. Alle diese Veränderungen im Blutbild waren jedoch minim und normalisierten sich nach Abbruch der Thalidomidgaben [85]. Die beim Menschen vorkommende periphere Neurotoxizität, scheint bei der bei Hunden verwendeten Dosierung nicht vorzukommen [86].

Wegen den allfälligen Nebenwirkungen der nichtsteroidalen Entzündungshemmer auf die Nieren (verminderte glomeruläre Perfusion), sollte bei Niereninsuffizienz ein metronomisches Protokoll ohne nichtsteroidalen Entzündungshemmer gewählt werden.

3.2 Zirkulierende endotheliale Zellen

3.2.1 Konzept/Definition

Zirkulierende endotheliale Zellen wurden vor mehr als 30 Jahren erstmals beschrieben [87-89].

Diese Zellen sind bei verschiedenen Erkrankungen, bei denen die Angiogenese eine Rolle spielt, erhöht. Dazu gehören vaskuläre-, ischämische-, infektiöse- und Autoimmunerkrankungen sowie verschiedene Tumorerkrankungen [8]. Man unterscheidet zwischen undifferenzierten Vorläuferzellen und ausdifferenzierten endothelialen Zellen. Asahara et al. identifizierten und isolierten erstmals zirkulierende endotheliale Vorläuferzellen und zeigten, dass diese in vitro zu reifen endothelialen Zellen ausdifferenzieren [14].

Man geht davon aus, dass die **zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen** (circulating endothelial progenitors; CEPs) aus dem Knochenmark stammen. Unklar ist, ob sie von hämatopoetischen Stammzellen/Hämangioblasten, myeloiden Zellen oder mesenchymalen Stammzellen abstammen [8, 90]. CEPs weisen einen Durchmesser von weniger als 20µm auf und kommen beim gesunden Menschen nur in sehr geringer Anzahl in der Blutzirkulation vor. Verschiedene Studien haben unterschiedliche Werte gemessen. Im Jahr 2001 haben Mancuso et al. Werte von <500 CEP/ml ermittelt [91], in den nach 2009 publizierten Studien waren es 181 CEP/ml [92] bzw. 740 CEP/ml [93]. Weitere Werte sind 260 CEP/ml [94], 0.24 CEP/ml [95] und 32 CEP/ml [96]. Alle diese Werte wurden mittels Durchflusszytometrie gemessen. Die unterschiedlichen Zahlen könnten darauf zurückzuführen sein, dass es bisher keinen Konsensus bezüglich Definition und Messmethode zirkulierender endothelialer Zellen gibt. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass CEPs zu reifen endothelialen Zellen ausdifferenzieren können [14-19]. Es wird vermutet, dass die CEPs durch Wachstumsfaktoren wie VEGF und stromal derived factor-1, welche von vielen Tumorzellen bzw. endothelialen Zellen des Tumors gebildet werden können, zum Wachstum stimuliert und aus dem Knochenmark ausgeschüttet werden [11-13]. Die CEPs gelangen über die Blutbahn zu sich bildenden Blutgefäßen eines Tumors und differenzieren dort zu reifen endothelialen Zellen aus [4, 97]. Weiter wurde gezeigt, dass CEPs ein hohes Proliferationspotential haben und die Fähigkeit besitzen, Zellkolonien zu bilden. Ihr vermehrtes Vorkommen in der Blutzirkulation bei oben genannten Erkrankungen deutet auf Neovaskularisation (Neubildung von Blutgefäßen) hin [98].

Es wird vermutet, dass die **reifen zirkulierenden endothelialen Zellen** (circulating endothelial cells; CECs) aus den ausgereiften Gefäßwänden selber stammen. Ihr Vorkommen in der Zirkulation ist ein Hinweis auf Gefäßschädigung bzw. entsteht durch normale Zellerneuerung. Beim gesunden Menschen geht man, je nach Publikation, von Werten von <3/ml [99-102], 0-4/ml [103], 6/ml [104, 105], 0-15/ml [106], 4.3-33/ml [95], 10-100/ml [107], 11-43/ml [96], 121/ml [108], 140/ml [92], 330-4700/ml [94], 7900/ml [91] oder 14500/ml [93] aus. Eine mögliche Erklärung für diese unterschiedlichen Zahlen könnten unterschiedliche Messmethoden und Zelldefinitionen sein. Mittels immunomagnetischer Isolierung wurden tiefere Werte (<3/ml, 0-4/ml, 6/ml) gemessen als mittels Durchflusszytometrie und die erhaltenen Werte stimmen zwischen den verschiedenen Studien eher überein als bei den durchflusszytometrischen Messungen. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass es für die durchflusszytometrischen Messungen keinen Konsensus bezüglich

Zelldefinition mittels Antikörper gibt (siehe auch Kapitel 3.2.4) und auch nicht über die genaue Gatesetzung bei der Analyse. Studien über die Messung mittels immunomagnetischer Isolierung weisen eine grössere Übereinstimmung in Zelldefinition und Messmethode auf [98, 109]. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass bei der Messung mittels Durchflusszytometrie nicht ausschliesslich CECs gemessen wurden, sondern auch hämatopoetische Zellen [110]. Beim gesunden Hund wurden mittels immunomagnetischer Isolierung Werte von 24-70/ml gemessen [111].

CECs zeigen eine limitierte Wachstumskapazität, da sie bereits ausgereifte Zellen sind. Sie haben einen Durchmesser von 20 bis 50µm [98]. Ein diskutiertes Merkmal der CECs sind die sogenannten Weibel-Palade-Bodies. Es handelt sich um Granula endothelialer Zellen, die Von-Willebrandfaktor und P-Selectin enthalten, welche bei der Leukozytenemigration ins Gewebe und bei der Blutgerinnung eine Rolle spielen. Das Vorhandensein von Weibel-Palade-Bodies wird in einer Studie als Beweis diskutiert, dass die mutmasslichen CECs tatsächlich endothelialer Natur sind [92].

3.2.2 Zirkulierende endotheliale Zellen und Tumorerkrankungen

Man vermutet, dass zirkulierende endotheliale Progenitorzellen (CEPs) an der Tumorangiogenese und an der Metastasenbildung beteiligt sind. Erstmals wurde dies 2001 von Lyden et al. gezeigt. Transplantierte, aus dem Knochenmark stammende CEPs waren am Wiederauftreten der Tumorangiogenese in angiogenesedefekten, tumorresistenten Mäusen beteiligt [17]. Verschiedene Studien zeigen jedoch eine unterschiedliche Beteiligung der CEPs an der Tumorangiogenese und stellen somit teilweise deren Wichtigkeit an der Gefässneubildung in Frage. In einer Studie stammten bis zu 50% der Zellen der Tumorgefässe in einem Fibrosarkom-Xenotransplantat in Rosa-26 Mäusen von CEPs ab [112]. Spring et al. zeigten wiederum anhand von transgenen Mausmodellen, dass CEPs v. a. in der Spätphase der Tumolvaskularisation eine Rolle spielen und dass bis zu 38% der Tumorgefässe auf CEPs zurückgehen [97]. Im Gegensatz dazu stammen in einer anderen Studie jedoch nur ca. 5% der Tumorendothelzellen von aus dem Knochenmark transplantierten Zellen ab [113]. Stoll et al. wiederum gehen von einer CEP-Beteiligung an der Tumorangiogenese v. a. im frühen Stadium des Tumorwachstums aus [114]. In einer anderen Studie war die CEP-Beteiligung an Tumorgefässen in einem Modell für ins Gehirn metastasiertes Mammakarzinom 58%, wohingegen sie in einem Modell für Brustkrebs nur 1.5% betrug [115].

Eine mögliche Erklärung für diese diskrepanten Resultate könnte sein, dass verschiedene Studien unterschiedliche Tumortypen, -grade und -größen untersucht haben. In diesem Zusammenhang zeigten Ruzinova et al., dass die CEPs an der Neovaskularisation von einigen, aber nicht von allen von ihnen untersuchten Tumoren beteiligt waren. Die Beteiligung der CEPs an der Tumolvaskularisation war unterschiedlich zwischen gut differenzierten und schlecht differenzierten Prostatakarzinomen. Ferner zeigten sie, dass die CEPs initial massgeblich an der Tumolvaskularisation beteiligt sind, während ihre Beteiligung in der späten Tumolvaskularisierung aber nur eine untergeordnete Rolle spielte [8, 116]. In dieser Hinsicht ist es wahrscheinlich, dass die oben erwähnten Studien, welche nur eine geringe Beteiligung der CEPs an der Tumolvaskularisierung gefunden haben, diese in bereits gut etablierten Tumoren untersucht haben. Folglich ist es durchaus vorstellbar, dass die CEPs an der Entstehung von Tumorrezidiven nach Operationen, Bestrahlung oder Chemotherapie beteiligt sind [8]. Eine weitere Interpretation der unterschiedlichen Resultate ist, dass die Analyse des Phänotyps der CEPs in den verschiedenen Studien limitiert war und dass verlässliche Methoden zur Unterscheidung von in Gefäße inkorporierten, aus dem Knochenmark stammenden endothelialen Zellen und eng miteinander verbundenen perivaskulären Zellen fehlen. Es ist gut möglich, dass die verschiedenen Studien unterschiedliche Zellpopulationen gemessen haben [90, 117].

Bei verschiedenen malignen humanen Tumoren wurden erhöhte Werte an CEPs und auch CECs in der Blutzirkulation festgestellt [9, 10, 73, 91, 106, 107]. Eine mögliche Erklärung könnte eine erhöhte Konzentration an angiogenen Wachstumsfaktoren sein, namentlich VEGF, basic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-1 und hepatocyte growth factor. Diese werden durch Tumorzellen selber bzw. Stromazellen gebildet, v. a. sobald die Angiogenese stimuliert wird (angiogenic switch) bzw. durch Remodellierung der Blutgefäße [8, 15]. Gemessene Werte für CECs und CEPs bei Tumorpatienten variieren je nach Publikation und Krankheitsbild. Diese reichen von 1.8-204.9 CEC/ μ l bei Lymphompatienten [73] über 951 CEC/ml und 429 CEP/ml bei Patienten mit verschiedenen Tumorerkrankungen [92]. Allerdings wurden in einer weiteren Studie von Mancuso et al. mit Brustkrebs- und Lymphompatienten Werte von 39.1 CEC/ μ l für ruhende bzw. 6.8 CEC/ μ l für aktivierte CEC gemessen [91]. Eine andere Studie publizierte Werte von 0-179 CEC/ml bei Patienten mit metastasierten Karzinomen [106]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass erhöhte oder ansteigende CEC Werte ein Anzeichen für progressive Erkrankung sind [108].

In der Veterinärmedizin existieren bisher keine Angaben über die Mengen von CECs und CEPs bei verschiedenen Tumorerkrankungen.

3.2.3 Zirkulierende endotheliale Zellen und metronomische Chemotherapie

Es gibt einige Publikationen, die belegen, dass die metronomische Chemotherapie einen Effekt auf die CECs und CEPs hat. In einer Studie von Bocci et al. wurden verschiedenen Zelllinien (endotheliale Zellen, Fibroblasten, chemosensitive und multiresistente Brustkrebszellen) mit verschiedenen Chemotherapeutika wie Paclitaxel (4-Hydroperoxycyclophosphamid, BMS-275183; ein orales Taxan), Doxorubicin und Etoposid B behandelt. Die Medikamente wurden auf zwei unterschiedliche Arten angewendet: zum einen wurden die Zelllinien mit einer einzelnen Chemotherapeutikugabe behandelt (24h), zum anderen mit einer verlängerten kontinuierlichen, niedrig dosierten Chemotherapeutika-Exposition (144h), welche vergleichbar mit einer metronomischen Chemotherapie ist. Während bei 24-stündiger Exposition nur geringe Effekte auf die Zelllinien festgestellt wurden, konnte bei der kontinuierlichen Exposition eine massive Hypersensitivität der vaskulären endothelialen Zellen gezeigt werden. Die Resultate weisen darauf hin, dass kontinuierliche niedrig dosierte Chemotherapeutikagaben u. a. einen selektiven Effekt auf zirkulierende endotheliale Zellen haben könnten und diese Art von Chemotherapie eine mögliche antiangiogene Therapie darstellt [20]. Shaked et al. testeten ein modifiziertes metronomisches Protokoll (Cyclophosphamid-Bolusgaben alle 3 oder 6 Wochen kombiniert mit oralen niedrig dosierten Cyclophosphamidgaben) in einem Mausmodell für Prostatakrebs und muriner Erythroleukämie. Nebst Verträglichkeit, Ansprechen und Überlebenszeiten wurden auch die zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen untersucht. Im Prostatakrebsmodell waren die vitalen CEPs nach einer Woche Behandlung in allen drei Behandlungsgruppen (Bolusgabe, täglich niedrig dosiert, Bolusgabe + täglich niedrig dosiert) erniedrigt. Im murine Erythroleukämie Modell waren im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe die vitalen CEPs nach einer Woche Behandlung sowohl in der niedrig dosierten Gruppe wie auch in der Bolus + niedrig dosierten Gruppe signifikant erniedrigt. In beiden Modellen führte das modifizierte metronomische Protokoll (Bolusgabe + niedrig dosiert) sowohl nach sechs wie auch nach zwölf Wochen Therapie zu erniedrigten Werten an vitalen CEPs [68].

In einer klinischen Studie wurde gezeigt, dass bei unbehandelten Brustkrebspatientinnen sowohl die absolute Gesamtzahl wie auch der prozentuale Anteil der lebenden CECs erhöht sind. Die CEPs und CECs wurden mittels Durchflusszytometrie gemessen und ihre Viabilität mittels eines Apoptosemarkers untersucht. Bei Patientinnen unter metronomischer Chemotherapie war die Anzahl der CEPs immer um 5% tiefer als die Zahl der CECs und es gab keine Korrelation zwischen der Anzahl CEPs und dem klinischen Ergebnis. Bei Patientinnen jedoch, die von der Therapie profitierten, stiegen die Zahlen der totalen CECs

an, was auf ein Ansteigen der Zahl der apoptotischen CECs zurückzuführen war. Patientinnen, die zwei Monate nach Therapiebeginn CEC-Werte von mehr als 11/ μ l zeigten, hatten signifikant längere Überlebenszeiten als diejenigen mit weniger als 11CEC/ μ l. Die metronomische Therapie hatte daher einen Einfluss auf die endothelialen Zellen und führte zur Apoptose der selbigen [10].

Die metronomische Therapie und die MTD-Therapie haben vermutlich eine unterschiedliche Wirkung auf die CEPs. Bertolini et al. verglichen an einem Mausmodell für humanes Lymphom die Wirkung von Cyclophosphamid in metronomischer und MTD-Dosierung auf die CEPs. Einerseits konnte gezeigt werden, dass in erkrankten Mäusen die CEPs im Vergleich zu gesunden signifikant erhöht waren und bei unbehandelten Mäusen parallel zum Tumorwachstum anstiegen. Bei der Gruppe, welche die MTD-Dosierung erhielt, zeigte sich einige Tage nach Gabe ein dramatischer Anstieg der CEPs. Im Gegensatz dazu waren die Werte bei Mäusen unter metronomischer Therapie nicht erhöht und die Viabilität der CEPs war signifikant reduziert. Als mögliche Erklärung wurde diskutiert, dass es in den Pausen zwischen den Verabreichungen der MTD-Therapie als adaptive Antwort auf die durch die Chemotherapie induzierte Myelosuppression zur Freisetzung von hämatopoetischen Vorläuferzellen und CEPs aus dem Knochenmark kommt [9].

Zusammenfassend lässt sich daraus schliessen, wie bereits in Kapitel 3.1.2 gezeigt, dass zumindest ein Teil der Wirkung der metronomischen Chemotherapie auf die Schädigung der endothelialen Zellen zurückzuführen ist. Da im Gegensatz zur MTD-Chemotherapie klare Endpunkte wie eine partielle oder komplette Remission bei der metronomischen Chemotherapie meist fehlen, könnte die Messung dieser endothelialen Zellen helfen, Aussagen über das Ansprechen auf die Therapie zu ermöglichen und somit auch über die Prognose Aussagen zu machen. In der Veterinärmedizin wurden bisher keine Studien zur Messung zirkulierender endothelialer Zellen unter metronomischer Chemotherapie publiziert. Da diese Therapieform jedoch aufgrund ihrer Verträglichkeit und in der Regel einfachen Verabreichung immer häufiger auch bei Kleintieren gewählt wird, ist es auch in der Veterinärmedizin von Interesse, eine optimale biologische Dosis zu definieren. CECs bzw. CEPs könnten diesbezüglich als Marker für die Therapieeffektivität eines Medikamentes in metronomischer Dosierung herangezogen werden.

3.2.4 Messmethoden/-techniken

Initial wurden zirkulierende endotheliale Zellen mikroskopisch lediglich anhand ihrer Morphologie identifiziert, diese Methode weist allerdings eine schlechte Spezifität auf und Zielzellen konnten nicht eindeutig identifiziert werden [118]. Dignat-George et al. beschrieben als eine der ersten monoklonale Antikörper zur Identifizierung zirkulierender endothelialer Zellen mittels immunomagnetischer Isolierung. Blut wurde mit anti-CD146 Antikörpern versetzt, die ihrerseits mit magnetischen Kügelchen gekoppelt waren. Die Zielzellen im Blut, welche die Antikörper banden, wurden dann mittels eines magnetischen Feldes isoliert. CECs wurden anschliessend aufgrund von Von-Willebrand Faktor Expression und Fehlen von CD45 identifiziert [8, 119]. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass CD146 vermutlich auch von aktivierten Lymphozyten und mesenchymalen Zellen exprimiert wird, welche bei Krebspatienten ebenfalls erhöht sein können. Der endotheliale Ursprung der isolierten Zellen müsste somit bei dieser Methode anschliessend durch zusätzliche Marker bestätigt werden [8]. In einer Studie von Woywodt et al. wurden mutmassliche CECs ebenfalls immunomagnetisch mittels CD146 isoliert. Nach der Isolation wurden die Zellen mit UEA-1 (*Ulex europaeus* agglutinin), einem spezifischen Marker für endotheliale Zellen, markiert, um ihren endothelialen Ursprung zu bestätigen, und fluoreszenzmikroskopisch gezählt. Erhaltene Werte für die CECs lagen bei 0-4/ml [103]. Die immunomagnetische Zellisolierung stellt eine eher umständliche und zeitaufwändige Methode dar, da die Zellen anhand ihrer Morphologie, Grösse und Anzahl magnetischer Kügelchen, die sie gebunden haben, identifiziert werden müssen. Diese Faktoren sind sehr variabel und werden subjektiv bewertet. Die der Isolierung folgenden Markierung mit spezifischen Antikörpern zur genaueren Identifizierung der Zellen, ist daher sehr wichtig. Bisher gibt es keinen Konsensus bezüglich der genauen Definition der CECs mittels immunomagnetischer Isolierung [103]. Im Gegensatz dazu stellt die Durchflusszytometrie eine einfache und daher viel genutzte Möglichkeit zur Identifizierung der zirkulierenden endothelialen Zellen dar. Dabei wird Blut gleichzeitig mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern versetzt. Die Zielzellen werden durch die Bindung der spezifischen Antikörper, welche ein Fluorochrom tragen, markiert und mittels dem Durchflusszytometer anhand von FSC (forward scattered light, vorwärts gestreutes Licht), SCC (sideward scattered light, seitwärts gestreutes Licht) und Fluoreszenz analysiert und charakterisiert. Das FSC ist abhängig von der Grösse einer Zelle, das SCC von der Granularität und interner Komplexität einer Zelle. Ein Vorteil der Durchflusszytometrie gegenüber der immunomagnetischen Isolierung ist die schnelle Analyse der Zellen, die

Möglichkeit der Unterscheidung von Subpopulationen (z.B. aktivierten oder apoptotischen Zellen) und die Möglichkeit, gleichzeitig mehrere spezifische Antikörper als Marker benutzen zu können. Eine Schwierigkeit der Messung besteht darin, dass endotheliale Zellen zwar eine Vielzahl von Oberflächenmarkern exprimieren, diese aber auch von anderen Zellen wie z. B. hämatopoetischen Vorläuferzellen oder Thrombozyten exprimiert werden können (siehe Tabelle 1). Es gibt somit keine endothelzell-spezifischen Antikörper, welche man alleine zur Unterscheidung von CECs, CEPs und hämatopoetischen Vorläuferzellen heranziehen könnte. In der Regel werden daher Antikörperlkombinationen eingesetzt, um die Zielzellen möglichst genau von anderen zirkulierenden mononukleären Zellen abzugrenzen, sowie zwischen CECs und CEPs unterscheiden zu können. Ein Problem ist, ähnlich wie bei der immunomagnetischen Isolierung, der fehlende Konsensus, welche Antikörperlkombination benutzt werden soll, um diese Zielpopulation präzise zu messen. In diesem Zusammenhang werden zirkulierende endotheliale Zellen z. T. sehr unterschiedlich definiert und identifiziert.

Für einige Jahre wurde angenommen, dass CD146 und CD144 spezifische endotheliale Marker seien [120]. Neuere Studien zeigten jedoch, dass sowohl mesenchymale Zellen wie auch Subpopulationen von aktivierten Lymphozyten CD146 exprimieren können und dass CD144 auch von frühen hämatopoetischen Stammzellen in der fetalen Leber exprimiert wird [121-123]. Bei den meisten Protokollen wird anti-CD45, ein Panleukozytenmarker, zum Ausschluss hämatopoetischer Zellen genutzt und anschliessend in der CD45 negativen Population die endothelialen Zellen mittels ihrer Expression von endothelialen Markern wie CD146, VEGFR2 und CD31 identifiziert [9, 10, 91, 92, 94, 96, 106, 124-127]. Eine häufig beschriebene Antikörperlkombination für die Identifizierung der CECs ist die Kombination von anti-CD45, anti-CD31 und anti-CD146 [10, 92, 94, 106, 126]. Zum Ausschluss von aggregierten Plättchen und endothelialen Mikropartikeln, welche mit den CECs überlappende Phänotypen aufweisen können, und zur Identifizierung von Subpopulationen scheint es sinnvoll, zusätzlich Kernfärbungen (nuclear staining) oder genormte fluoreszierende Partikel (flow check beads) einzusetzen [92, 106]. In einer Studie von Strijbos et al. wurde die oben erwähnte Definition von CECs als CD45-CD31+CD146+ Zellen überprüft, eine Kernfärbung wurde jedoch nicht durchgeführt. Die Studie konnte mittels dieser Definition keine CECs nachweisen und kam zum Schluss, dass es sich bei den fraglichen Zellen um grosse Thrombozyten handelte [128]. Eine Möglichkeit wäre unter Umständen auch Thrombozyten mittels Ficollgradient auszuschliessen und endotheliale Mikropartikel anhand ihrer Grösse beim Setzen der Analysefenster. Weitere beschriebene Antikörperlkombinationen zur Messung der CECs sind anti-CD45, anti-CD146, anti-CD31, anti-CD34, anti-CD105 und

anti-CD106 [91] bzw. anti-CD45, anti-CD34, anti-CD146 und anti-CD309 (VEGFR2) [96]. Die Antikörper gegen CD105 und CD106 wurden zur Unterscheidung von aktivierten versus nicht-aktivierten endothelialen Zellen benutzt [91]. CD34 wird von hämatopoetischen Stammzellen und z. T. auch von Thrombozyten exprimiert, nicht aber von reifen hämatopoetischen Zellen. Dieser Marker wurde somit häufig zur Identifizierung von Zellen mit klonogenem Potential benutzt. CD34 wird aber auch von reifen endothelialen Zellen exprimiert und kann somit nicht wie z. T. angenommen zur Unterscheidung von CECs und CEPs herangezogen werden [8].

Zurzeit scheint CD133 der einzige Marker zu sein, welcher nur von CEPs exprimiert wird, in CECs aber herunterreguliert ist [129]. Daher bietet es sich an, CD133 zur Unterscheidung zwischen CECs und CEPs zu benutzen. Da CD133 beim Menschen jedoch auch von hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert wird [130, 131], wird der Marker in Kombination mit anderen Markern wie CD146, CD31, VEGFR2 und CD34 zur Identifizierung der CEPs herangezogen [10, 92, 94, 124, 125].

Einigen Studien, welche CD34+CD133+VEGFR2+ Zellen als CEPs definiert und gemessen haben, wurde der Vorwurf gemacht, dass sie wahrscheinlich hämatopoetische Vorläuferzellen gemessen haben und nicht zirkulierende endotheliale Vorläuferzellen. Es wurde gezeigt, dass CD34+CD133+ Zellen auch positiv für CD45 waren, und dass diese Zellen sowohl morphologische als auch funktionelle Eigenschaften von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen aufwiesen. In der Folge wurden sie als proangiogene hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen und nicht als CEPs interpretiert [110, 132-134].

Kürzlich erschien eine Studie, welche ein neues Messprotokoll für CECs und CEPs vorstellt. CECs wurden als CD31+CD34^{bright}CD45-CD133-CD14-CD41a-CD235a-LIVE/DEAD Violet- definiert. Bei den Progenitorzellen wurden proangiogene (CD31+CD34^{bright}CD45^{dim}CD133+CD14-CD41a-CD235a-LIVE/DEAD Violet-) und nicht angiogene Zellen (CD31+CD34^{bright}CD45^{dim}CD133-CD14-CD41a-CD235a-LIVE/DEAD Violet-) unterschieden. Die CECs wurden als endothelial colony forming cells definiert. Die Unterscheidung zwischen CECs und CEPs geschah anhand von abwesender bzw. schwacher CD45 Färbung (CD45- bei CECs vs. CD45^{dim} bei CEPs). Die CEPs wurden, im Gegensatz zu anderen Studien, als CD133- (und CD45-) definiert und somit als nicht hämatopoetischen Ursprungs [133]. Da auch bei der Messung der CEPs bisher kein Konsensus zwischen verschiedenen Studien besteht und es unklar ist, ob es sich bei den jeweils gemessenen Zellen auch wirklich um CEPs handelte, wurde der Vorschlag gemacht, den Begriff CEP allenfalls in Zukunft nicht mehr zu verwenden, da unter ihm wahrscheinlich verschiedene Zellpopulationen

zusammengefasst wurden, die man einzeln ansprechen könnte, beispielsweise Thrombozyten, hämatopoetische Vorläuferzellen, Monozyten und Makrophagen [134].

Tabelle 1: exprimierte Oberflächenmarker

DNA: Desoxyribonucleinsäure

RNA: Ribonucleinsäure

	CEPs	CECs	Mikropartikel Endothelialer Zellen	Thrombozyten	Erythroblasten	Lymphozyten	reife myeloide Zellen	hämato- poetische Vorläufer
DNA								
RNA								
CD45								
CD133								
CD34								
CD105								
CD146								
CD144								
CD31								
CD13								
CD117								
VEGFR1								
VEGFR2								
VEGFR3								

	positiv
	schwach positiv
	negativ
	Subpopulationen

Modifiziert nach Bertolini et al. [8]

Auch in der Veterinärmedizin wurden bisher einige Studien zur Messung zirkulierender endothelialer Zellen durchgeführt. Wie in der Humanmedizin stellt sich auch bei den CEC- und CEP-Messungen beim Hund die Frage, ob jeweils wirklich die gefragten Zielpopulationen gemessen wurden. Offen ist auch, ob sich die Messmethoden und Zelldefinitionen der Humanmedizin auf die Veterinärmedizin und die Messungen bei Hunden übertragen lassen.

Wu et al. isolierten mittels Ficoll-Paque Plus die mononukleären Zellen des peripheren Blutes eines Hundes. Ziel war es eine einfache Methode zur Isolation und Differenzierung von CEPs anhand der endothelialen Morphologie, Oberflächenmarkerexpression und Proliferationspotential zu etablieren. Die isolierten Zellen wurden während drei Wochen auf fibronectin-beschichteten Zellkulturplatten kultiviert. Um das Wachstum von endothelialen Progenitorzellen zu bestätigen, wurden die Veränderungen der Zellmorphologie mittels Phasenkontrastmikroskopie beobachtet. Die kultivierten Zellen wurden mit fluoreszierenden Antikörpern (CD34, VEGFR2, CD146) markiert und durchflusszytometrisch analysiert. Während der dreiwöchigen Kultivierungsphase verschob sich die Expression der Oberflächenmarker zu einem reiferen endothelialen Phenotypen, d.h. die Expression von CD34 ging zurück, wohingegen die Expression von VEGFR2 anstieg. Die Expression von CD146 blieb unverändert. Als kritisch zu betrachten ist bei dieser Studie, dass nicht nach spezifischen Markern für endotheliale Vorläuferzellen selektiert wurde, es wäre also durchaus möglich, dass die mononukleäre Zellfraktion mehr als eine Population von Vorläuferzellen enthielt, wie z. B. hämatopoetische Vorläuferzellen [135].

Xia et al. haben bei Hunden mit künstlich erzeugter pulmonärer arterieller Hypertension endotheliale Progenitorzellen im Blut mittels Durchflusszytometrie gemessen. Zirkulierende endotheliale Progenitorzellen wurden als CD133+ und VEGFR2+ Zellen definiert und die absolute Zahl pro ml Blut mittels TruCOUNT (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) bestimmt [136]. Auch bei dieser Studie stellt sich die Frage, ob die gemessenen CD133+VEGFR2+ Zellen wirklich nur endotheliale Zellen darstellen oder ob es sich nicht auch um hämatopoetische Vorläuferzellen handeln könnte, wie in der Humanmedizin z. T. festgestellt [110, 132].

In einer anderen Studie wurden zirkulierende endotheliale Zellen immunomagnetisch mit anti-CD146 Antikörpern bei gesunden Hunden isoliert. Die Zellen wurden anschliessend mit UEA-1 (Ulex europaeus agglutinin 1), einem Protein mit starker Affinität für endotheliale Zellen, inkubiert und unter dem Mikroskop analysiert. CECs wurden wie folgt definiert: die Zellen mussten mehr als 5 magnetische Kügelchen gebunden haben, mussten einen Durchmesser von 10-50 µm aufweisen und positiv für UEA-1 sein. Der endotheliale Ursprung der Zellen wurde mittels UEA-1 bestätigt. Gemessene Werte für die CECs lagen zwischen 24 bis 70 CEC/ml (im Mittel 43.4/ml) [111]. Zu bedenken ist bei dieser Studie, dass es bei der immunomagnetischen Isolierung der CECs möglich ist, dass auch CEPs mitgemessen wurden, da nur ein Marker benutzt wurde [111].

3.3 Zielsetzungen

Ziel der Arbeit war es, ein neues metronomisches Chemotherapieprotokoll bei Hunden mit unterschiedlichen Tumorerkrankungen auszuwerten. Untersucht wurden Verträglichkeit und Nebenwirkungen sowie Akzeptanz der Therapie durch die Besitzer. Daneben wurden progressionsfreie und Überlebenszeit der Tiere unter metronomischer Chemotherapie berechnet.

Ein zweites Ziel war es, ein Protokoll zur Messung zirkulierender endothelialer Zellen im Blut von Hunden zu etablieren und im Folgenden vergleichend zirkulierende endotheliale Zellen bei gesunden und bei an Tumoren erkrankten Hunden zu messen.

4. Material und Methoden

4.1 Teil A: Metronomische Chemotherapie in klinischer Anwendung

Studienaufbau

Für die vorliegende Studie wurden in retrospektiver Art die Krankengeschichten von Hunden unter metronomischer Chemotherapie der Abteilung für Radio-Onkologie, Vetsuisse-Fakultät Zürich, und des Centro Oncologico Veterinario in Bologna, Italien, ausgewertet. Die Studienzeit umfasste knapp zwei Jahre (2009-2011). Die Hunde wurden regelmässig evaluiert, d. h. Kontrollen wurden einen Monat nach Therapiebeginn und anschliessend alle drei Monate durchgeführt. Untersucht wurden Verträglichkeit der Medikation, Ansprechen auf die Therapie, Grund für die metronomische Therapie sowie progressionsfreie Zeit und Überlebenszeit.

Patienten und Einschlusskriterien

In die Studie wurden Hunde eingeschlossen, welche an einer zytologisch und/oder histologisch bestätigten Neoplasie erkrankt waren und mit einer metronomischen Chemotherapie behandelt wurden. Die Behandlungsdauer musste mindestens 30 Tage betragen. Alter, Rasse, Tumorart, Tumorstage und Art der Vorbehandlung spielten keine Rolle für den Einschluss in die Studie.

Behandlungsprotokoll

Die Hunde erhielten 10 mg/m^2 Cyclophosphamid per os jeden 2. Tag, 3-6 mg/kg Thalidomid per os einmal täglich und einen nichtsteroidalen Entzündungshemmer in für Hunde etablierter Dosierung.

Bei progressiver Erkrankung wurde die Dosierung des Cyclophosphamids auf 10 mg/m^2 jeden Tag erhöht. Bei inakzeptablen Nebenwirkungen wurde die Gabe auf jeden dritten Tag reduziert.

Abweichungen des Protokolles waren Chlorambucil (4 mg/m^2 per os einmal täglich) anstelle von Cyclophosphamid bei Hunden mit Übergangszellkarzinom in der Blase, Prednisolon

anstelle eines nichtsteroidalen Entzündungshemmers und Cyclophosphamid in Kombination mit Thalidomid ohne nichtsteroidalem Entzündungshemmer, wenn die Hunde erhöhte Nierenwerte oder eine bekannte Unverträglichkeit gegenüber dieser Medikamentengruppe zeigten.

Klinische Beurteilung (Follow-up)

Die Hunde wurden jeweils einen, drei, sechs, neun und zwölf Monate nach Therapiebeginn re-evaluiert. Zur klinischen Beurteilung gehörten eine klinische Untersuchung, die Beurteilung des Allgemeinbefindens anhand der klinischen Untersuchung und anhand von Fragebögen für Besitzer (siehe Anhang 2). Die Beurteilung gastrointestinaler Nebenwirkungen erfolgte anhand der Anamnese und eines Fragebogens. Bei jeder Kontrolle wurde eine hämatologische Untersuchung durchgeführt. Die Beurteilung der Tumorausbreitung und das Vorhandensein neuer Läsionen wurde, je nachdem ob Bildgebung (Röntgen, CT) durchgeführt wurde, subjektiv oder objektiv beurteilt. Die gastrointestinalen und hämatologischen Nebenwirkungen wurden anhand der Richtlinien der Veterinary Co-operative Oncology Group in vier Grade eingeteilt (siehe Anhang 3) [137].

Statistische Auswertung

Das Ansprechen auf die Therapie wurde nach RECIST Kriterien [138] wie folgt definiert: Complete remission (CR): 100%ige Reduktion des Tumors; partial remission (PR): Reduktion von mehr als 30% (Summe der längsten Durchmesser) und keine neuen Läsionen; stable disease (SD): stabile Erkrankung, d. h. weder PR noch progressive Erkrankung für 6 Wochen und mehr; progressive disease (PD): fortschreitende Erkrankung, Zunahme der Summe der längsten Durchmesser um 20% und mehr; progression free interval (PFI): Progressionsfreie Zeit, als Zeit vom Start der metronomischen Therapie bis Fortschreiten der Erkrankung; overall survival (OS): Überlebenszeit, als Zeit vom Start der metronomischen Therapie bis zum Tod/Euthanasie. Überlebenszeiten und progressionsfreie Zeiten wurden gemäss der Kaplan-Meier Methode und mit dem Logrank-Test analysiert. P-Werte von ≤ 0.05 wurden als signifikant angeschaut. Die statistische Auswertung wurde mittels StatView 5.0.1 (Firma SAS, Cary, USA) durchgeführt.

4.2 Teil B: Protokoll zur Messung zirkulierender endothelialer Zellen beim Hund

Blutentnahme

Mittels Vacutainer (Greiner Bio-One, Österreich) wurde bei 9 gesunden und 8 an Tumoren erkrankten Hunden 6 ml Blut entnommen. Die ersten 2 bis 3 ml Blut wurden jeweils verworfen. Das Blut wurde in 6 ml Lithium-Heparinröhrchen (Greiner Bio-One, Österreich) gesammelt und anschliessend sofort verarbeitet.

Probenaufbereitung

Mittels Ficolldichtegradient (Becton Dickinson, USA) wurden die mononukleären Zellen isoliert und zweimal mit PBS (Sigma-Aldrich Chemie, Deutschland) gewaschen. Anschliessend wurden die Zellen gezählt und auf Röhrchen (Polystyrene Round-Bottom Tubes, Becton Dickinson, USA) verteilt, sodass jedes Röhrchen mindestens 1 Mio. Zellen enthielt. In jedes Röhrchen wurde 20%iges Hundeserum zur Verhinderung unspezifischer Bindung der Antikörper gegeben. Anschliessend wurden die Zellen mit spezifischen, fluoreszierenden Antikörpern [15µl CD45-APC (Allophycocyanin)=rot, AbD Serotec, UK; 1µl CD146-PE (Phycoerythrin)=hellgrün, Millipore, USA; 2µl CD133-FITC (fluorescein isothiocyanate)=grün, eBioscience, USA] versetzt und 30 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 7AAD (7µl, Becton Dickinson, USA) einem DNA-Farbstoff, welcher nur tote Zellen färbt, zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen, versetzt und anschliessend im Durchflusszytometer gemessen. Um die ideale Antikörperkonzentration zu ermitteln, wurden die Antikörper tritriert.

Durchflusszytometrie

Eine vier-Farben durchflusszytometrische Messung wurde mit Hilfe eines FACSCalibur (Becton Dickinson, USA), welches einen roten und einen blauen Laser enthält, durchgeführt, mit anschliessender Analyse mit der FlowJo 887 Software. Es wurde immer 1 Mio. Zellen gemessen. Die Analysefenster (Gates) wurden folgendermassen gesetzt: Zuerst wurden mittels der 7AAD-Färbung die toten Zellen ausgeschlossen (Abbildung 1), anschliessend in der lebenden Zellpopulation die CD146+ Zellen identifiziert (Abbildung 2) und weiter die CD45+ Zellen ausgeschlossen (Abbildung 3). Die CEC wurden als CD146+/CD45- und die

CEP als CD133+/CD146+/CD45- definiert und identifiziert (Abbildung 3 und 4). Als Negativkontrolle wurde jeweils eine ungefärbte Blutprobe analysiert (Abbildung 5-8).

Abbildung 1:
lebende/tote Zellen

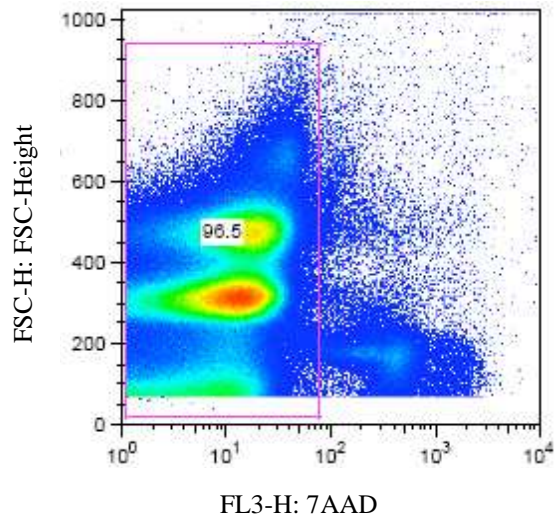


Abbildung 2:
CD146+ Zellen

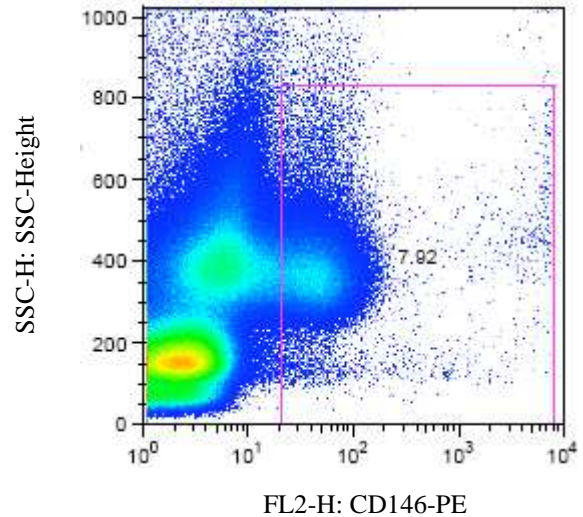


Abbildung 3:
Ausschluss CD45+ Zellen
CECs

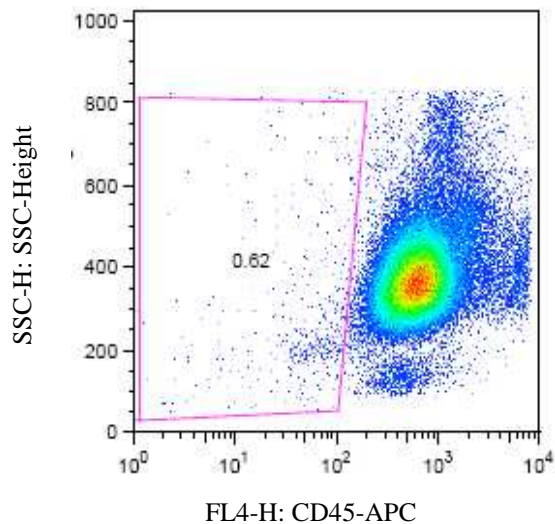


Abbildung 4:
CEPs

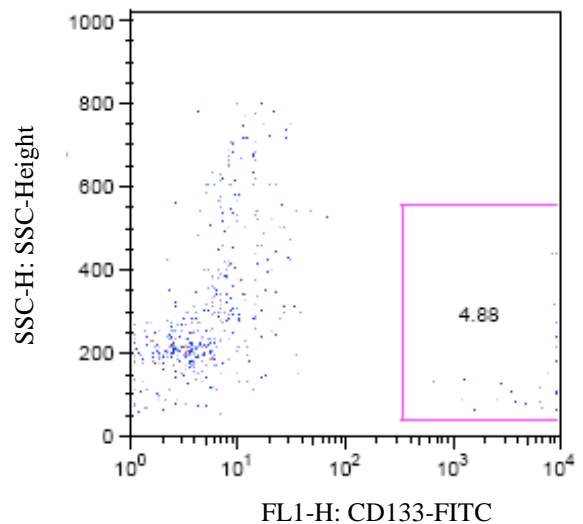


Abbildung 5:
Negativkontrolle

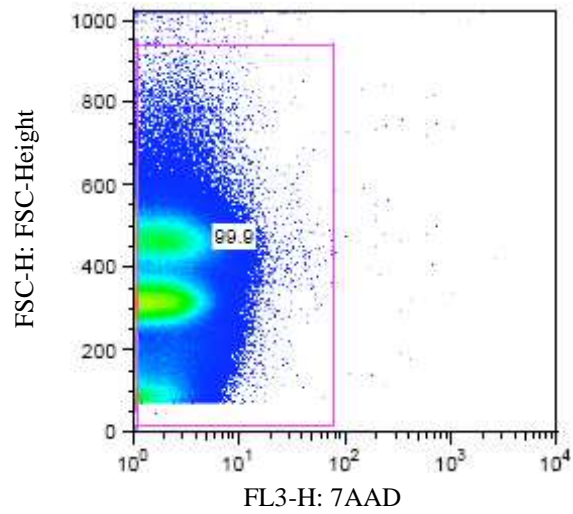


Abbildung 6:
Negativkontrolle

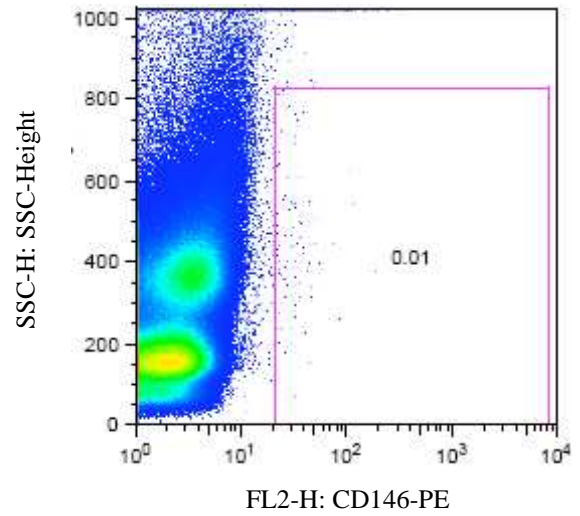


Abbildung 7:
Negativkontrolle

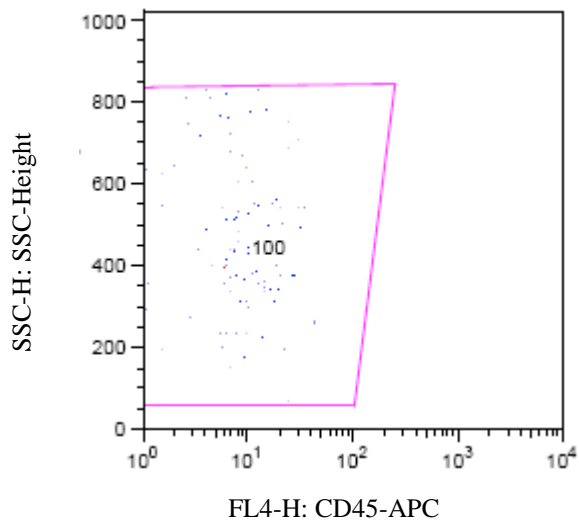
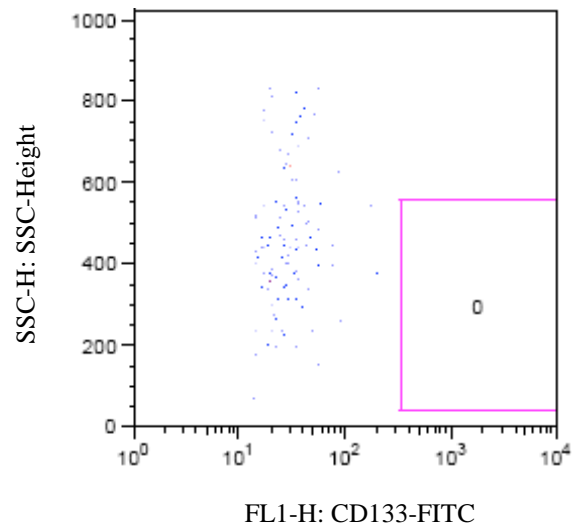


Abbildung 8:
Negativkontrolle



Zellzahlangabe

Die Zielzellen werden pro 1 Mio. gezählte mononukleäre Zellen (MNZ) angegeben.

Anhand der mononukleären Zellen pro ml Blut (Hämatologie), den gemessenen Prozentzahlen und den gezählten Zellen pro jeweiligem Analysefenster wurde zusätzlich die absolute Zahl der Zielzellen pro ml berechnet.

Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mittels StatView 5.0.1 (Firma SAS, Cary, USA) und NCSS 2007 Version 7.20.1 durchgeführt. Der nichtparametrische Mann-Whitney U Test wurde zur Überprüfung, ob sich die Mediane der verschiedenen Zellen in den beiden Gruppen signifikant unterscheiden, benutzt. P-Werte von ≤ 0.05 wurden als signifikant angeschaut.

In der deskriptiven Statistik werden die Mediane angegeben, in Klammern jeweils das 10. und 90. Perzentil.

5. Resultate

5.1 Teil A: Metronomische Chemotherapie in klinischer Anwendung

Es konnten 36 Hunde in die Studie aufgenommen werden. Die mediane Beobachtungszeit betrug 103 Tage. Sechzehn der Hunde waren männlich und 20 weiblich und 22 waren kastriert. Unterschiedliche Rassen und Mischungen waren vertreten (siehe Tabelle 2). Das mittlere Alter betrug 9.9 Jahre (range 3.5-14.0), das mittlere Gewicht 26.6 kg (range 3.8-52 kg). Einunddreissig der Hunde erhielten die metronomische Therapie, weil sie austherapiert waren oder keine Standardtherapie für ihre Erkrankung existiert, 5 Hunde wurden aus finanziellen Gründen und ethischen Bedenken bezüglich anderer Therapien von Seiten der Besitzer mit der metronomischen Chemotherapie behandelt. Sechs Hunde erhielten Cyclophosphamid (6.26-15.89 mg/m² SID oder EOD) in Kombination mit Thalidomid (1.68-9.26 mg/kg SID oder EOD), 3 Hunde erhielten Cyclophosphamid (6.26-15.89 mg/m² SID oder EOD) zusammen mit einem NSAIA und 23 Hunde wurden mit Cyclophosphamid (6.26-15.89 mg/m² SID oder EOD), Thalidomid (1.68-9.26mg/kg SID oder EOD) und einem NSAIA behandelt. 4 Hunde erhielten Chlorambucil (4mg/m² SID oder EOD). Als NSAIA kamen Carprofen, Piroxicam, Firocoxib, Meloxicam und Robenacoxib in üblicher Dosierung zum Einsatz. Die eingeschlossenen Hunde litten an verschiedenen Tumorerkrankungen (siehe Tabelle 3). Dreizehn Hunde hatten zu Beginn der metronomischen Chemotherapie mikroskopische Erkrankung (nach Operation oder Bestrahlung, kein Tumor vorhanden), 23 Hunde hatten makroskopische Erkrankung (makroskopischer Tumor). Elf von 25 evaluierbaren Hunden hatten zum Zeitpunkt des Therapiestarts bereits Fernmetastasen. Fünfundzwanzig Hunde waren zu Beginn der metronomischen Therapie bereits mit anderen Therapien wie Chirurgie, Bestrahlung und MTD-Chemotherapie oder Kombinationen dieser Therapien vorbehandelt (siehe Tabelle 4).

Tabelle 2: vertretene Hunderassen

Rasse	Anzahl
Golden Retriever	1
Akita Inu	1
Australian Shepherd	1
Beagle	1
Berger Blanc Suisse	1
Berner Sennenhund	1
Boxer	1
Bulldogge	1
Bullterrier	1
Cane corso	1
Chinese Crested Dog	1
Dalmatiner	2
Deutscher Schäfer	1
Flat Coated Retriever	1
Groenendael	1
Grosser Münsterländer	1
Kooikerhondje	1
Labrador Retriever	1
Lagotto romagnolo	1
Leonberger	1
Mischling	9
Mops	1
Podenco Ibicenco	1
Riesenschnauzer	1
Saluki	1
Shetland Shepherd	1
Spinone italiano	1

Tabelle 3: Tumorerkrankungen, mikroskopische/makroskopische Erkrankung

Tumorart	Anzahl Patienten	mikroskopisch	makroskopisch
Hämangiosarkom	5	3	2
Osteosarkom	4	4	0
TCC Blase/Urethra	4	0	4
Weichteilsarkom	3	1	2
Prim. Lungentumor	3	2	1
Mammatumor	2	0	2
Melanom	2	0	2
Karzinom	2	0	2
Mesotheliom	2	2	0
Histiozytäres Sarkom	1	0	1
Analbeutelkarzinom	1	0	1
Plattenepithelkarzinom	1	0	1

Chondrosarkom	1	0	1
Plexustumor	1	0	1
Granulosazelltumor	1	1	0
Multilobuläres Osteosarkom	1	0	1
Mesenchymale Neoplasie Mesenteriallymphknoten	1	0	1
Nasenhöhlentumor	1	0	1

Tabelle 4: Vorbehandlung

Therapie vor metronomischer Therapie	Anzahl Patienten
Keine	11
Chirurgie + MTD-Chemotherapie	8
Chirurgie	7
Bestrahlung	4
MTD Chemotherapie	3
Bestrahlung + Chx + MTD-Chemotherapie	1
Bestrahlung + MTD-Chemotherapie	1
Bestrahlung + Chirurgie	1

Es wurden v. a. Grad 1 und Grad 2 hämatologische oder gastrointestinale Nebenwirkungen beobachtet. 6 Hunde entwickelten eine Grad 1 Anämie, 2 Hunde mit HSA bzw. TCC eine Grad 2 Anämie, diese Hunde zeigten vor Therapiebeginn Grad 3 Anämie (HSA) bzw. entwickelte die Anämie nach 9 Monaten Therapie (TCC mit Blutverlust über den Urin). Zwei Hunde mit HSA entwickelten eine Grad 4 Anämie, vor Therapie zeigten diese Hunde eine Grad 1 bzw. Grad 3 Anämie. 3 Hunde entwickelten eine Grad 1 Thrombozytopenie, 1 Hund mit HSA eine Grad 4 Thrombozytopenie, dieser Hund zeigte bei Therapiebeginn normale Thrombozytenwerte. Keiner der Hunde entwickelte im Verlauf der Therapie eine Neutropenie. Zwei Hunde von 5 auswertbaren zeigten nach sechsmonatiger Therapie erhöhte Harnstoffwerte, 1 Hund von 6 auswertbaren zeigte einen erhöhten Kreatininwert.

4 Hunde zeigten unter Therapie vorübergehend Grad 1 Erbrechen und 5 Hunde zeigten vorübergehend leichtgradigen Durchfall. 3 Hunde zeigten Grad 1 Anorexie, 1 Hund Grad 2 Anorexie. Sechs von 19 auswertbaren Hunden zeigten Müdigkeit nach Thalidomidgabe; keiner der 36 Hunde zeigte Anzeichen einer sterilen hämorrhagischen Zystitis.

18 von den 36 Hunden erreichten SD für eine Zeitdauer von mindestens 6 Wochen. Die mediane progressionsfreie Zeit für alle 36 Hunde betrug 98 Tage (95% CI: [0, 224]), für die Hunde mit makroskopischer Erkrankung betrug sie 57 Tage (95% CI: [0, 121]), für die Hunde

mit mikroskopischer Erkrankung 434 Tage (95% CI: [0, 932]). Die mediane progressionsfreie Zeit war signifikant unterschiedlich für Hunde mit mikroskopischer versus makroskopischer Erkrankung ($P=0.04$, Abbildung 9). Die mediane Überlebenszeit für alle Hunde betrug 264 Tage (95% CI: [128, 401]). Für die Hunde mit makroskopischer Erkrankung betrug sie 264 Tage (95% CI: [66, 463]), während sie für die Hunde mit mikroskopischer Erkrankung zum Zeitpunkt der Analyse noch nicht erreicht war. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen mikroskopischer und makroskopischer Erkrankung bezüglich OS ($P=0.72$, Abbildung 10).

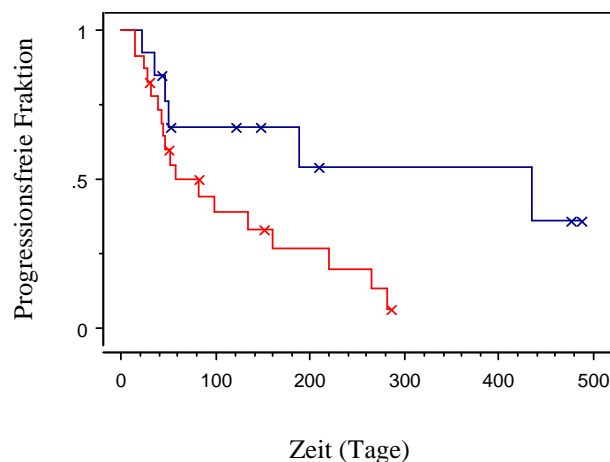


Abbildung 9:
Mediane progressionsfreie Zeit:
Blau mikroskopische Erkrankung,
rot makroskopische Erkrankung
Hunde, die zum Zeitpunkt der
Analyse progressionsfrei waren oder
die Therapie abgebrochen hatten,
wurden zensiert.
Signifikanter Unterschied zwischen
mikroskopischer/makroskopischer
Erkrankung ($P = 0.04$)

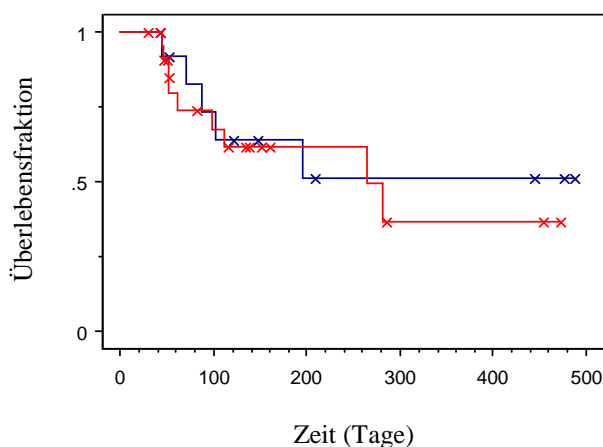


Abbildung 10:
Mediane Überlebenszeit:
Blau mikroskopische Erkrankung,
rot makroskopische Erkrankung
Hunde, die zum Zeitpunkt der
Analyse noch lebten oder die
Therapie abgebrochen hatten,
wurden zensiert.
Kein signifikanter Unterschied
zwischen
mikroskopischer/makroskopischer
Erkrankung ($P = 0.72$)

Fünf von den 13 Hunden mit mikroskopischer Erkrankung blieben zu Beginn der Therapie für mindestens drei Monate erkrankungsfrei. Einer dieser Hunde, welcher zuvor einen primären Lungentumor hatte, erkrankte 122 Tage nach Therapiestart an einem Lymphom in der Leber, Milz und den abdominalen Lymphknoten und wurde auf eine andere Therapie umgestellt. Ein zweiter Hund, mit einem Weichteilsarkom, erkrankte 209 Tage nach Therapiestart an einem HSA in der Leber und wurde auf eine andere Therapie umgestellt. Zum Zeitpunkt der Analyse

sind 3 der Hunde mit mikroskopischer Erkrankung seit 487, 476 bzw. 147 Tagen erkrankungsfrei.

5.2 Teil B: Protokoll zur Messung zirkulierender endothelialer Zellen beim Hund

Mittels Durchflusszytometrie wurden die zirkulierenden endothelialen Zellen bei 9 gesunden und 8 kranken Hunden gemessen. Das mittlere Alter der gesunden Hunde betrug 6.11 Jahre (range 1-11.5), das der kranken Hunde 7.75 Jahre (range 4.5-13). Das mittlere Gewicht der gesunden Hunde lag bei 18.22 kg (range 11-24 kg), das der kranken Hunde bei 16.4 kg (range 3.15-37 kg). Bei den gesunden Hunden waren 3 männlich, 6 weiblich, bei den kranken 6 männlich und 2 weiblich. Sowohl bei den kranken wie auch bei den gesunden Hunden waren verschiedene Rassen vertreten, die kranken Hunde litten an verschiedenen Tumoren (siehe Tabellen 5 und 6).

Tabelle 5: vertretene Hunderassen

Rasse	Anzahl
Berner Sennenhund	1
Border Collie	2
Chihuahua	1
Jack Russel Terrier	2
Labrador Retriever	2
Mischling	5
Norfolk Terrier	1
polnischer Niederungshütehund	1
Whippet	1
Yorkshire Terrier	1

Tabelle 6: Tumorerkrankungen

Tumorart	Anzahl
Lymphom	2
Rundzellneoplasie Leber	1
Mastzelltumor	2
Mammatumor	1
Epitheliale Neoplasie	1
Sarkom	1

Die gesunden Hunde zeigten signifikant höhere Werte an mononukleären Zellen (Hämatologie), der mediane Wert für die gesunden Hunde lag bei 3410/ μ l [2400; 5960], für die kranken Hunde bei 2265/ μ l [1120; 4240] ($P=0.01$).

Die medianen Werte der CEC pro 1 Mio. gezählte MNZ waren bei den kranken Hunden signifikant höher als bei den gesunden, 1627/1 Mio. MNZ [534; 2262] versus 487/1 Mio. MNZ [334; 6205] ($P=0.04$, Abbildung 11). Bei den medianen absoluten Zahlen pro ml zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den kranken und den gesunden Hunden, bei den kranken Hunden lag der mediane Wert bei 2604/ml [1348; 9591], bei den gesunden bei 1641/ml [1400; 18801] ($P=0.39$, Abbildung 13). Die medianen Werte für die CEP waren nicht signifikant unterschiedlich für die kranken bzw. gesunden Hunde. Der mediane Wert für die gesunden betrug 56/1. Mio. MNZ [20; 358], für die kranken 119/1 Mio. MNZ [32; 232] ($P=0.18$, Abbildung 12). Auch bei den absoluten Zahlen pro ml gab es keinen signifikanten Unterschied, 201/ml [68; 1221] bei den gesunden versus 229/ml [36; 687] bei den kranken ($P=0.85$, Abbildung 14).

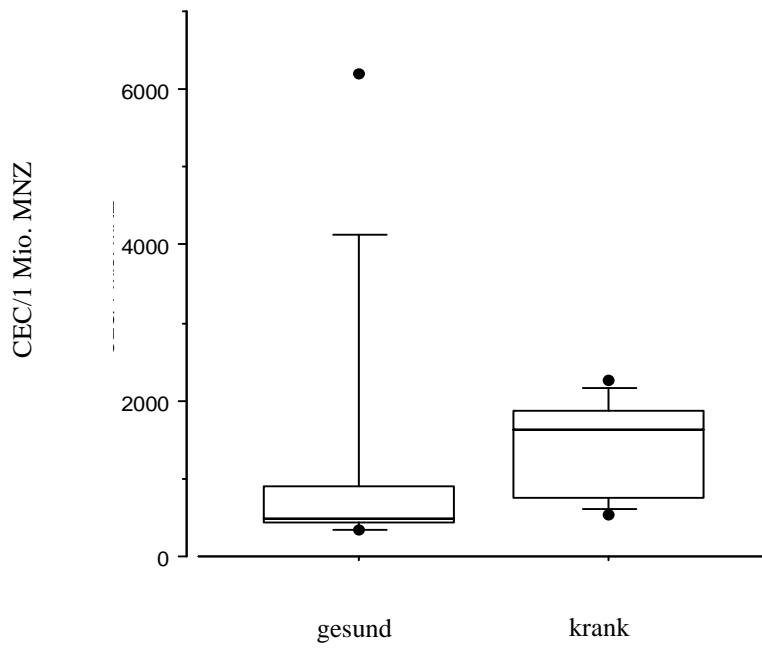


Abbildung 11:
Box plot CEC/1 Mio.
MNZ; kranke Hunde haben
signifikant höhere Werte
als gesunde ($P = 0.04$).

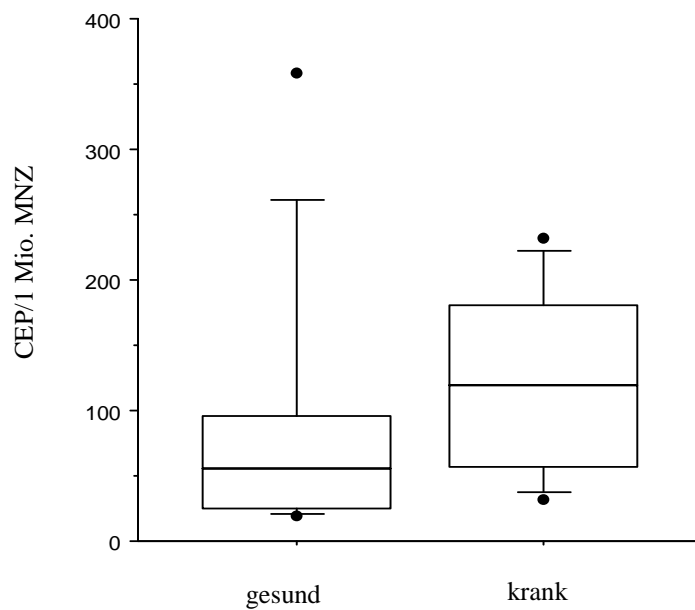


Abbildung 12:
Box plot CEP/1 Mio.
MNZ; kein
signifikanter
Unterschied zwischen
gesunden und kranken
Hunden ($P = 0.18$)

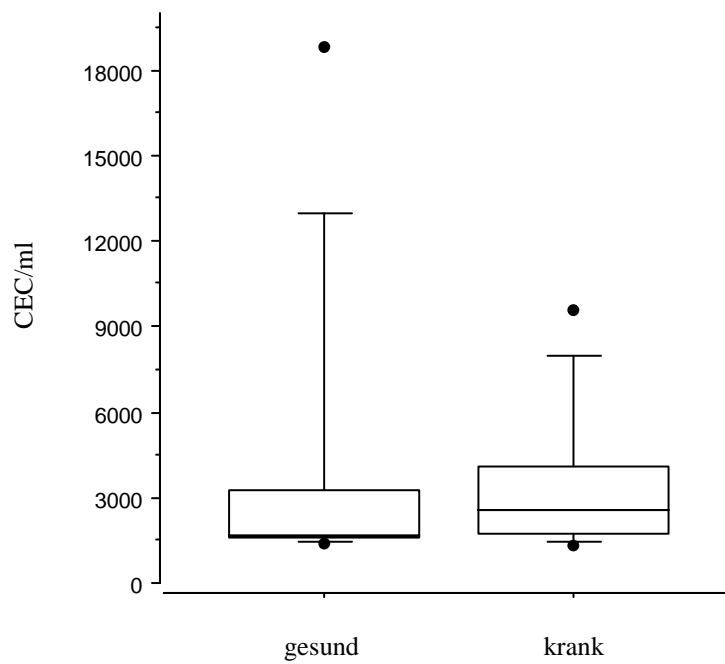


Abbildung 13:
Box plot CEC/ml; kein
signifikanter
Unterschied zwischen
gesunden und kranken
Hunden (P = 0.39)

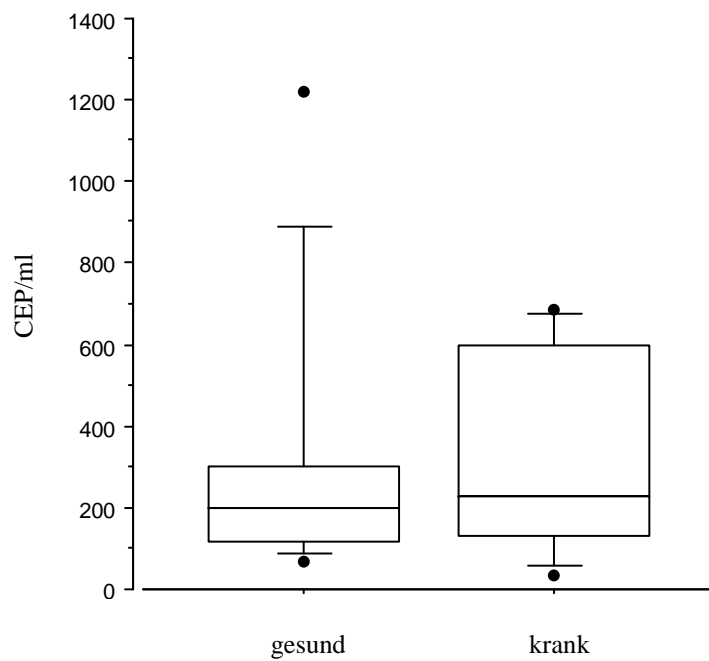


Abbildung 14:
Box plot CEP/ml; kein
signifikanter
Unterschied zwischen
gesunden und kranken
Hunden (P = 0.85)

6. Diskussion

6.1 Teil A: Metronomische Chemotherapie in klinischer Anwendung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Wirksamkeit und die Verträglichkeit eines neuen metronomischen Chemotherapieprotokolls beim Hund untersucht. Bisher in der Veterinärmedizin beschriebene Protokolle beinhalteten Cyclophosphamid und einen nicht-steroidalen Entzündungshemmer [42, 43], Cyclophosphamid im Wechsel mit Etoposid und einen nicht-steroidalen Entzündungshemmer [44], Cyclophosphamid, Chlorambucil oder Lomustine als alleinige Therapie [34, 81, 139]. Unsere Kombination von Cyclophosphamid oder Chlorambucil, Thalidomid und einem nicht-steroidalen Entzündungshemmer ist bisher nicht beschrieben. Neu ist vor allem die Verwendung von Thalidomid in Kombination mit den anderen Medikamenten. In der Humanmedizin sind wenige Studien zur Verwendung von Thalidomid als Komponente einer metronomischen Chemotherapie bekannt [10, 41]. Die antiangiogene und immunstimulatorische Wirkung von Thalidomid sind Schlüsselwirkungen der metronomischen Chemotherapie. Es ist daher wahrscheinlich, dass Thalidomid den Effekt von metronomisch verabreichten Chemotherapeutika wie Cyclophosphamid unterstützt und eventuell auch verstärkt.

Ähnlich wie in der bisherigen veterinärmedizinischen Literatur beschrieben [34, 42-44, 81, 139], wurde auch unser verwendetes Protokoll mit 10 mg/m^2 Cyclophosphamid jeden 2. Tag (oder 4 mg/m^2 Chlorambucil jeden Tag bei TCC), $3\text{-}6 \text{ mg/kg}$ Thalidomid jeden Tag und einem nicht-steroidalen Entzündungshemmer im Allgemeinen gut vertragen und es kam zu keinen schweren Nebenwirkungen. In einer Pilotstudie von Marchetti et al. und in einer Studie von Burton et al. mit 25 mg/m^2 Cyclophosphamid und 2 mg/kg Celecoxib einmal täglich bzw. 12.5 mg/m^2 oder 15 mg/m^2 Cyclophosphamid einmal täglich zeigten die Hunde weder hämatologische noch gastrointestinale Nebenwirkungen [34, 42]. In der Arbeit von Burton et al. wird diskutiert, dass das Fehlen von Nebenwirkungen in ihrer Arbeit darauf beruhen könnte, dass sie keinen nicht-steroidalen Entzündungshemmer verabreicht haben, sondern nur Cyclophosphamid und dass in anderen Studien beschriebene Nebenwirkungen auf den nicht-steroidalen Entzündungshemmer zurückzuführen sein könnten. Dies steht aber im Gegensatz zur Studie von Marchetti et al., bei welcher nebst Cyclophosphamid in einer weit höheren Dosierung auch ein nicht-steroidaler Entzündungshemmer verabreicht wurde

und trotzdem keine Nebenwirkungen beobachtet wurden. Eine weitere Studie, in welcher die Hunde mit 4 mg/m^2 Chlorambucil einmal täglich behandelt wurden, zeigte nur milde gastrointestinale Nebenwirkungen bei vier von insgesamt 36 Hunden [139]. In zwei Studien wurden sterile hämorrhagische Zystitiden beobachtet, eine bekannte Nebenwirkung des Cyclophosphamids [43, 44]. In der einen Studie erhielten die Hunde 10 mg/m^2 Cyclophosphamid in Kombination mit einem nicht-steroidalen Entzündungshemmer einmal täglich, in der anderen Studie $12.5\text{-}25 \text{ mg/m}^2$ Cyclophosphamid täglich für drei Wochen im Wechsel mit 50 mg/m^2 Etoposid und zusätzlich einen nicht-steroidalen Entzündungshemmer. In beiden Studien waren die hämatologischen und gastrointestinalen Nebenwirkungen, wenn vorhanden, mild. In der einen Studie zeigten allerdings 2 von 30 Hunden erhöhte Kreatininwerte unter Therapie, welche nach Umstellung der Piroxicamgabe auf jeden 2. Tag wieder auf die Ausgangswerte sanken [43].

Es ist mitunter schwierig zu unterscheiden, ob eine Nebenwirkung der Therapie oder der Primärerkrankung zuzuschreiben ist, so waren in unserer Studie z.B. 2 von 6 Hunden, welche während der Therapie eine Grad 1 Anämie entwickelten, progressiv in ihrer Erkrankung (Mammatumors, OSA). Ein weiterer Hund der 6 Hunde mit Grad 1 Anämie litt an einem TCC und entwickelte ein Rezidiv eines früher therapierten und sich zunächst in kompletter Remission befindenden multizentrischen Lymphoms. Ein zweiter Hund mit TCC verlor zeitweise Blut über den Urin, bei einem dritten Hund mit OSA war die milde Anämie vorübergehend. Bei einem Hund, der während der metronomischen Behandlung eine Grad 1 Anämie entwickelte, war diese vermutlich auf die Therapie zurückzuführen, dieser Hund litt an einem Leberkarzinom und hatte zum Zeitpunkt der Anämieentwicklung stabile Erkrankung.

Ein Hund, bei welchem unter der Therapie eine Grad 2 Anämie dokumentiert wurde, litt an einem HSA und zeigte vor Therapiestart eine Grad 3 Anämie. Der zweite Hund mit einer Grad 2 Anämie, entwickelte diese erst nach 9 Monaten Therapie. Dieser Hund hatte ein TCC in der Blase und begann Blut über den Urin zu verlieren. Die zwei Hunde, welche unter Therapie eine Grad 4 Anämie entwickelten, zeigten vor der Therapie bereits Grad 1 und Grad 3 Anämien und litten beide an einem HSA in der Milz bzw. Leber und Milz und zeigten progressive Erkrankung. Da die Veränderungen des Hämatokrits v. a. bei Hunden mit progressiver Erkrankung oder bereits stark fortgeschrittener Erkrankung auftraten, ist es möglich dass die beobachteten Veränderungen vermutlich nur bedingt durch die Therapie hervorgerufen wurden, sondern eher krankheitsbedingt (durch intermittierende Blutung aus

dem Tumor bedingt) waren. Auch bei anderen veterinärmedizinischen Studien, welche Nebenwirkungen beobachtet haben, wäre es unter Umständen möglich, dass die Nebenwirkungen nicht ausschliesslich auf die Therapie zurückzuführen sind [44, 139].

Keiner der 36 Hunde entwickelte eine Neutropenie. Dies deutet darauf hin, dass es durch die Therapie nicht zu einer klinisch bedeutsamen Myelosuppression kam. Dies ist insofern wichtig, da es durch eine Myelosuppression vermutlich zu einer Freisetzung von zirkulierenden endothelialen Zellen kommen kann, welche wiederum die Blutgefässbildung im Tumor unterstützen würden, gerade dies soll aber durch die metronomische Chemotherapie verhindert werden (siehe Kapitel 3.2.1, 3.2.2 und 3.2.3).

Die gastrointestinalen Nebenwirkungen waren in unserer Studie ebenfalls mild und vorübergehend, vergleichbar zu den anderen beschriebenen Studien [43, 44, 139]. Bei drei Hunden mit Grad 1 Durchfall ist es fraglich, ob dieser therapiebedingt war. Einer der Hunde lebte in einem Haushalt mit einem Welpen, der zur selben Zeit vorübergehenden Durchfall zeigte, zwei andere Hunde hatten vor dem Auftreten des Durchfalls laut Beobachtungen und Vermutungen der Besitzer etwas Unbekanntes gefressen.

In der vorliegenden Studie waren nur wenige Hunde bezüglich Harnstoff- und Kreatininwerte auswertbar. Bei insgesamt drei Hunden wurden aber erhöhte Harnstoff- oder Kreatininwerte dokumentiert (Harnstoff 103.7 mg/dl bzw. 50.9 mg/dl, Referenzbereich 10-40 mg/dl; Kreatinin 1.89 mg/dl, Referenzbereich 0-1.7 mg/dl). Dies könnte am ehesten durch den nichtsteroidalen Entzündungshemmer bedingt sein. Durch die Hemmung der Cyclooxygenase kommt es zu einer verminderten Prostaglandinausschüttung was wiederum zu einer verminderten glomerulären Perfusion führt und somit nephrotoxisch sein kann [140, 141]. Eine regelmässige Kontrolle der Harnstoff- und Kreatininwerte ist daher unter metronomischer Therapie sinnvoll. Bei erhöhten Werten kann versucht werden die Dosierung der Medikamente zu reduzieren, wie dies in der Studie von Elmslie et al. erfolgreich gezeigt wurde [43]. Bei hochgradiger renaler Azotämie, welche auch durch eine Reduktion oder Absetzen des nicht-steroidalen Entzündungshemmers nicht verbessert werden kann, muss in Betracht gezogen werden, die Therapie abubrechen.

Eine bekannte Nebenwirkung des Cyclophosphamids ist die sterile hämorrhagische Zystitis, hervorgerufen durch den Metaboliten Acrolein [46]. In unserer Studie zeigte keiner der Hunde Anzeichen für eine sterile hämorrhagische Zystitis, dies im Gegensatz zu zwei anderen bereits erwähnten Studien, bei welchen 2 von 9 bzw. 3 von 30 Hunden von dieser Nebenwirkung betroffen waren [43, 44]. Damit das Acrolein nicht lange in der Blase bleibt und diese reizt, empfehlen wir, das Medikament am Morgen zu geben, damit es über den Tag ausgeschieden

werden kann und der Metabolit Acrolein somit nur kurz mit der Blasenschleimhaut in Kontakt ist und diese folglich nicht übermässig reizen kann [46].

An Stelle von Cyclophosphamid könnte bei auftretender steriler hämorrhagischer Zystitis allenfalls die Substanz Chlorambucil verwendet werden [139]. Chlorambucil gehört wie Cyclophosphamid zu den alkylierenden Agentien, führt aber nicht zu steriler hämorrhagischer Zystitis. In unserer Studie wurde Chlorambucil nur den Hunden mit Übergangsepithelkarzinomen verabreicht, um die Symptome einer allfälligen hämorrhagischen Zystitis durch Cyclophosphamid von einer intravesikalen Blutung durch den Tumor unterscheiden zu können. Die kürzlich veröffentlichte Arbeit von Leach et al. untersuchte die Wirkung metronomisch verabreichten Chlorambucils bei verschiedenen Tumorerkrankungen des Hundes und zeigte vielversprechende Resultate. Chlorambucil könnte also durchaus eine Alternative für Hunde sein, welche unter Cyclophosphamid eine sterile hämorrhagische Zystitis entwickelt haben [139].

Die metronomische Chemotherapie wird normalerweise über lange Zeiträume verabreicht [2-4, 7]. In unserer Studie schien eine Gabe über lange Zeiträume, z. T. knapp 500 Tage, das Vorkommen von Nebenwirkungen nicht zu erhöhen. Auch eine vorangehende Therapie scheint die Verträglichkeit der metronomischen Chemotherapie nicht zu mindern. Bereits vorthherapierte Hunde zeigten keine verstärkten Nebenwirkungen.

Das in unserer Studie verwendete metronomische Protokoll beinhaltet als 3. Komponente Thalidomid, welches noch in keiner veterinärmedizinischen Studie als Bestandteil der metronomischen Chemotherapie verwendet wurde. Es interessierte daher, ob Nebenwirkungen aufgrund von Thalidomid auftraten. In der Humanmedizin sind verschiedene Nebenwirkungen auf Thalidomid bekannt (Müdigkeit, Somnolenz, Hautreaktionen, Konstipation, periphere Neurotoxizität, trockene Mundschleimhaut, Leber-enzymstörungen, Hypothyreose, Bradykardie, Depression, Venenthrombosen) [56], für den Hund ist diesbezüglich nur wenig bekannt. Die in der Toxizitätsstudie von Teo et al. beschriebenen Nebenwirkungen wie grün gefärbter Urin, vergrössertes und/oder blau verfärbtes Mammagewebe, verlängerte Östruszeiten, dilatierte Milchgänge, glanduläre Hyperplasie, erhöhte Gallenblasenpigmente, erhöhte Alkalische Phosphatase-, Chlorid- und Natriumwerte, erniedrigte Albumin-, Kalzium-, Kalium- und Bilirubinwerte, wurde bei unseren Patienten nicht beobachtet [56, 85, 86]. Einzig die erniedrigten Erythrozytenzahlen und die erhöhten Harnstoffwerte bei einigen Hunden könnten vielleicht auch zusätzlich durch das Thalidomid zustande gekommen sein. Diese Veränderungen sind in der Toxizitätsstudie ebenfalls beschrieben [85]. Ob die Hämatokrit- und Harnstoffabweichungen aber in unserer Studie

wirklich auch durch das Thalidomid verursacht wurden, kann nicht nachgewiesen werden. In unserer Studie zeigten, was in der Toxizitätsstudie nicht beobachtet wurde, in der Humanmedizin aber beschrieben ist [56], 6 von 19 auswertbaren Hunden Müdigkeit nach Thalidomidgabe. Die Symptome liessen sich mindern oder überbrücken, wenn das Thalidomid spät abends vor dem Schlafen verabreicht wurde oder die Dosis reduziert wurde. Andere Nebenwirkungen auf Thalidomid wurden nicht gesehen. Studien mit grösseren Fallzahlen sind jedoch in Zukunft nötig, um genauere Aussagen über die Nebenwirkungen auf Thalidomid zu ermöglichen.

Die Dosis des Thalidomids von 3-6 mg/kg einmal täglich wurde empirisch bestimmt. Auch dazu gibt es nur wenige Angaben aus der Tiermedizin. In den Toxizitätsstudien erhielten die Hunde 43, 200 oder 1000 mg/kg täglich und zeigten die bereits beschriebenen Nebenwirkungen [85, 86]. In einem kürzlich veröffentlichten Abstract zur Wirkung von Thalidomid bei Hämangiosarkomen erhielten die Hunde 100 bis 400 mg Thalidomid täglich und es wurden keine Nebenwirkungen beobachtet, leider konnten zur Wirksamkeit und zum klinischen Nutzen nur beschränkt Aussagen gemacht werden und die optimale Dosis müsse noch gefunden werden [45]. In der Humanmedizin sind Thalidomiddosen von 50 bis 200 mg täglich im Rahmen von metronomischen Chemotherapieprotokollen beschrieben [10, 41]. Die in der Humanmedizin verabreichten 50 bis 200 mg täglich entsprechen ca. einer Dosis von 1-4 mg/kg täglich, was etwas tiefer als unsere Dosis von 3-6 mg/kg täglich ist.

Die auffallende Tumorstabilisierung, welche bei vielen der Hunde in dieser Studie beobachtet wurde, deutet darauf hin, dass das angewandte metronomische Protokoll das Tumorwachstum hemmt. 18 Hunde erreichten stabile Erkrankung für mindestens 6 Wochen. Die mediane progressionsfreie Zeit für alle Hunde betrug 98 Tage und die mediane Überlebenszeit 264 Tage. Diese Resultate sind für eine so heterogene, z. T. vorthapierte Patientenpopulation mit teils stark fortgeschrittener Erkrankung, wie sie in dieser Studie vorliegt, beachtlich. In der Pilotstudie von Marchetti et al., welche ebenfalls eine sehr durchmischte Patientenpopulation mit verschiedenen metastasierten Tumoren eingeschlossen hatte, erreichten 5 von 15 Hunden stabile Erkrankung und ein Hund eine komplette Remission, die mediane Überlebenszeit für alle 15 Hunde betrug 3.39 Monate (103 Tage) [42]. Eine andere Studie, in der ebenfalls eine sehr durchmischte Patientenpopulation mit Chlorambucil behandelt wurde, zeigte stabile Erkrankung bei 17 von 36 Fällen. Die mediane progressionsfreie Zeit für alle Hunde betrug 61 Tage, die mediane Überlebenszeit 153 Tage [139].

Zwei weitere Studien untersuchten die Wirkung der metronomischen Chemotherapie bei Hunden mit Hämangiosarkomen der Milz nach Splenektomie und bei Hunden mit inkomplett exzidierten Weichteilsarkomen [43, 44]. Die mediane Überlebenszeit für die Hunde mit Hämangiosarkomen betrug 178 Tage und war signifikant länger als die mediane Überlebenszeit der mit Doxorubicin behandelten Kontrollgruppe [44]. Die Hunde mit inkomplett exzidierten Weichteilsarkomen hatten zu Studienende die mediane erkrankungsfreie Zeit noch nicht erreicht, die erwartete mediane erkrankungsfreie Zeit betrug aber mindestens 410 Tage, was signifikant länger ist als die mediane erkrankungsfreie Zeit von 211 Tagen der nicht-therapierten Kontrollgruppe [43].

Die progressionsfreien Zeiten und die Überlebenszeiten in unserer Arbeit sind vergleichbar zu denen der anderen Studien, ein Vergleich ist allerdings v. a. mit den zwei erstgenannten Studien möglich, welche ebenfalls eine sehr durchmischte Patientenpopulation untersucht haben. Wie auch unsere Studie, verfügten diese zwei Studien ebenfalls über keine Kontrollgruppe. Unsere beobachteten medianen progressionsfreien Zeiten und Überlebenszeiten waren etwas länger als die der zwei anderen Studien. Dies könnte evt. auf unser neues Protokoll zurückzuführen sein, kann aber auch an den uneinheitlichen Patientengruppen mit unterschiedlichen Tumorerkrankungen und Tumorstadien der verschiedenen Arbeiten liegen.

In Zukunft sind weitere Studien mit einheitlicheren Patientenpopulationen und zusätzlichen Messungen von Markern wie zirkulierenden endothelialen Zellen oder regulatorischen T-Zellen zur Verfolgung des Therapieverlaufes und zur Untersuchung der Wirkung der metronomischen Chemotherapie sinnvoll. Bisher ist in der Veterinärmedizin nur eine Studie zum Verlauf der Tregs unter metronomischer Chemotherapie publiziert [34]. Erste Messungen zirkulierender endothelialer Zellen bei an Tumoren erkrankten Hunden wurden im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit unternommen.

In unserer Studie wurde ein signifikanter Unterschied in den progressionsfreien Zeiten der Hunde mit mikroskopischer bzw. makroskopischer Erkrankung gezeigt. Diese Resultate und die der Studien mit Hunden mit Hämangiosarkomen und inkomplett exzidierten Weichteilsarkomen [43, 44] weisen darauf hin, dass die metronomische Therapie wahrscheinlich v. a. bei Hunden mit Tumoren mit hohem metastatischem Potential und bei Hunden mit minimaler Tumorlast (minimal residual tumor burden) wirksam ist. Die lange krankheitsfreie Zeit von mehr als 487 bzw. 476 Tagen zweier Hunde mit OSA und die Stabilisierung der Lungenmetastasen für 434 Tagen bei einem Hund mit OSA weist ebenfalls darauf hin und könnte auch darauf hindeuten, dass die metronomische Chemotherapie die

Metastasenbildung bzw. deren Fortschreiten hemmen kann. In verschiedenen Studien werden bei OSA mediane Überlebenszeiten von 320 bis 366 Tagen nach Amputation und Gabe von Doxorubicin, Carboplatin oder dieser zwei Chemotherapeutika im Wechsel beschrieben (zusammengefasst in [46]). In unserer Studie zeigten zwei bereits erwähnte Hunde mit OSA nach Amputation, Carboplatin-Gabe und anschließender metronomischer Chemotherapie krankheitsfreie Zeiten von mehr als 487 bzw. 476 Tagen. Die zwei Hunde sind bei Studienabschluss immer noch krankheitsfrei und leben somit schon länger als es die üblicherweise vorausgesagte Prognose erwarten lässt. Ob dies auf die metronomische Chemotherapie zurückzuführen ist, kann aufgrund der niedrigen Fallzahlen nicht beurteilt werden.

Die Dosis des Cyclophosphamids für die metronomische Chemotherapie wird oft empirisch bestimmt. Einerseits sollte die Dosis möglichst hoch sein, um eine maximale antiangiogene Wirkung zu erzielen, sollte aber andererseits keine Myelosuppression verursachen, die evt. zu einer Freisetzung von zirkulierenden endothelialen Progenitorzellen führen kann [43]. Die in unserem Protokoll verwendete Cyclophosphamiddosis von 10 mg/m^2 beruht auf den Resultaten der Studie von Elmslie et al., die sowohl eine gute Verträglichkeit als auch eine Wirkung bei inkomplett exzidierten Weichteilsarkomen gezeigt hat [43]. Andere Studien haben höhere Dosierungen von Cyclophosphamid (12.5 bis 25 mg/m^2) verwendet und haben trotz der höheren Dosis keine massiven Nebenwirkungen beobachtet [34, 42, 44]. Eine kürzlich erschienene Studie, welche die regulatorischen T-Zellen unter metronomischer Chemotherapie untersuchte, verwendete bei einem Teil der Hunde eine Cyclophosphamiddosis von 12.5 mg/m^2 einmal täglich, bei einem zweiten Teil der Patienten eine Dosis von 15 mg/m^2 einmal täglich. Bei der höheren Dosis wurde eine signifikante Reduktion der Treg sowie der Blutgefässdichte im Tumorgewebe festgestellt, allerdings sind diese Daten mit Vorsicht zu interpretieren, da die Studie nur wenig Fälle eingeschlossen hatte [34].

In der Pilotstudie von Marchetti et al. wurde eine Cyclophosphamiddosis von 25 mg/m^2 angewandt und keine massiven Nebenwirkungen gesehen [42]. Diese Studien weisen darauf hin, dass auch höhere Dosen von Cyclophosphamid gut vertragen werden. Es stellt sich somit die Frage ob es von Nutzen wäre eine höhere Cyclophosphamiddosis als 10 mg/m^2 zu verwenden. Eine Möglichkeit wäre auch, mit einer Dosis von 10 mg/m^2 zu starten und die Dosis dann zu steigern oder mit einer höheren Dosis zu starten und bei Auftreten von nicht-tolerierbaren Nebenwirkungen die Dosis zu reduzieren. In der Humanmedizin werden

Cyclophosphamiddosen von 25-50 mg/m² täglich verabreicht (siehe Zusammenstellung der Studien im Anhang), ebenfalls mit geringen Nebenwirkungen.

Unsere Daten zeigen, dass die metronomische Chemotherapie mit geringen Nebenwirkungen verbunden und gut verträglich ist, eine gute Lebensqualität der behandelten Hunde ermöglicht und zu guten Resultaten führt. Dies, zusammen mit den geringen Kosten und der einfachen oralen Verabreichung, macht diese Therapie auch interessant für Subpopulationen von Patienten. Zum Beispiel kann die metronomische Therapie eine Alternative für Patienten, für die eine MTD Chemotherapie nicht vertretbar ist, sein. In der Studie von Marcchetti et al. wurde eine Verbesserung der Symptome und der Lebensqualität unter metronomischer Chemotherapie beschrieben [42]. Dies wurde auch in einer humanmedizinischen Studie mit älteren Patienten, deren Gesundheitszustand keine MTD Chemotherapie erlaubte, beobachtet [72].

Fasst man die Resultate der bisher in der Veterinärmedizin publizierten Studien zur metronomischen Chemotherapie zusammen, zeigt sich, dass die metronomische Chemotherapie eine Wirkung bei verschiedenen Tumoren hat. In den verschiedenen Studien wurden unterschiedliche Protokolle verwendet und alle zeigten einen Effekt. Die Verwendung von Thalidomid wie in unserer Arbeit scheint vielversprechend und könnte die Wirkung des metronomisch verabreichten Cyclophosphamids unterstützen bzw. verstärken.

Nur zwei der bisher veröffentlichten Studien verfügten über eine Kontrollgruppe und ein Teil der Studien wies keine einheitliche Patientenpopulation auf. Um noch genauere Aussagen über die Wirkung der metronomischen Chemotherapie bei einzelnen Tumoren und auch die Prognosen machen zu können, sind Studien mit einheitlichen Patientengruppen nötig, wenn möglich zusätzlich mit einer Kontrollgruppe.

Die bisherigen Untersuchungen zur metronomischen Chemotherapie sind vielversprechend und lassen auf weitere nachfolgende und vertiefende Studien hoffen.

6.2 Teil B: Protokoll zur Messung zirkulierender endothelialer Zellen beim Hund

Bisher gibt es in der Veterinärmedizin keine publizierten Studien über die Messung von reifen zirkulierenden endothelialen Zellen (CEC) und Vorläuferzellen (CEP) bei gesunden und bei an Spontantumoren erkrankten Hunden mittels Durchflusszytometrie.

In unserer Pilotstudie haben wir zeigen können, dass diese Messung bei Hunden, möglich ist. Gleichzeitig ergaben unsere Messungen, dass kranke Hunde signifikant höhere Werte an CECs als gesunde Hunde hatten.

Die zirkulierenden endothelialen Zellen wurden mittels vier-Farben-Durchflusszytometrie gemessen. Anhand eines Ficollgradienten wurden die mononukleären Zellen isoliert und zirkulierende endotheliale Zellen anschliessend mittels Färbungen für CD45, CD146, und CD133 identifiziert.

Mittels CD45 wurden hämatopoetische Zellen ausgeschlossen und reife zirkulierende endotheliale Zellen anhand der Färbung für CD146 identifiziert. Vorläuferzellen wurden anhand der Doppelfärbung für CD146 und CD133 von reifen Zellen unterschieden. Das verwendete Messprotokoll wurde in Anlehnung an verschiedene Studien aus der Humanmedizin entwickelt [10, 91, 92, 94, 106, 126].

Ein kritischer Punkt ist, dass CECs nur anhand der Kombination CD146+/CD45- identifiziert wurden und damit evt. auch andere Zellpopulationen gemessen wurden. CD146 kann auch von mesenchymalen Zellen und von aktivierten Lymphozyten exprimiert werden, letztere sollten jedoch mittels CD45 weitgehend ausgeschlossen worden sein. Die zusätzliche Färbung mit einem anti-CD31-Antikörper als zweitem Marker wäre eine Möglichkeit, um in Kombination mit CD146 die gewünschte Zielpopulation einzuengen. Leider ist zur Zeit kein für die Durchflusszytometrie etablierter anti-CD31 Antikörper für den Hund erhältlich. Die Färbung mit einem Maus-anti-human CD31 Antikörper (Klon WM59, Becton Dickinson, USA) hat nicht funktioniert, der Antikörper wurde von den Hundezellen nicht gebunden (Daten nicht gezeigt). Ein nächster möglicher Schritt wäre, wie beschrieben [92], die anhand CD 45 und CD 146 sortierten CEC zusätzlich anhand des Vorhandenseins von Weibel-Palade Bodies zu identifizieren und dadurch die gewünschte Zielpopulation zu bestätigen. Weiterhin wäre die Evaluation anderer, für die durchflusszytometrische Untersuchung bereits vorhandener anti-CD31 Antikörper sinnvoll, die gegebenenfalls mit einem Farbstoff gekoppelt werden müssen.

Ein zusätzliches Problem bei der Messung zirkulierender endothelialer Zellen mittels Durchflusszytometrie können aggregierte Thrombozyten und endotheliale Mikropartikel sein, welche z. T. dieselben Oberflächenmarker wie zirkulierende endotheliale Zellen exprimieren. Eine Veröffentlichung von Strijbos et al. hat gezeigt, dass einige Studien vermutlich grosse Thrombozyten anstelle von zirkulierenden Endothelzellen gemessen haben [128]. Andere Studien haben Kernfärbungen und genormte fluoreszierende Partikel (flow check beads) eingesetzt, um Mikropartikel und Thrombozyten auszuschliessen [92, 106]. Wir gehen davon aus, in unserem Protokoll Blutplättchen und Mikropartikel durch die Benutzung des Ficollgradienten und von 7AAD hinreichend ausgeschlossen zu haben. Zusätzlich hat das benutzte FACSCalibur-Gerät einen Schwellenwert und misst nur Zellen und Partikel ab einer gewissen Grösse (2-3 μm). In einer Studie von Prokopi et al. wurde jedoch gezeigt, dass die durch Ficollgradient isolierte mononukleäre Zellfraktion trotzdem mit Thrombozyten kontaminiert sein kann [142]. Plättchen sind jedoch negativ für den Marker CD146, daher sollten die Blutplättchen mittels des Ficollgradienten und des nicht-Vorhandenseins von CD146 ebenfalls ausreichend ausgeschlossen worden sein.

Die Unterscheidung von reifen Endothelzellen und Vorläuferzellen geschah anhand von CD133. Dies ist gestützt auf verschiedene Publikationen, in welchen CD133 zur Unterscheidung von CECs und CEPs herangezogen wurde [10, 92, 94, 124, 125]. Wie in Kapitel 3.2.4 diskutiert, ist die Benutzung von CD133 zur Identifizierung der CEPs jedoch umstritten. Ursprünglich sollten CEPs in unserer Arbeit mit VEGFR-2 als zweitem Marker zusätzlich zu CD133 identifiziert werden. Die getesteten anti-VEGFR-2 Antikörper (Ratte-anti-Maus und Maus-anti-human, beide Becton Dickinson, USA) funktionierten aber nicht zuverlässig, sie liessen sich nicht titrieren und schienen konzentrationsabhängig unspezifisch zu färben und wurden deshalb wieder verworfen (Daten nicht gezeigt). Eine kürzlich veröffentlichte Expertenmeinung beschrieb ähnliche Probleme mit der Titration von VEGFR-2 [133]. Eine oft beschriebene Möglichkeit, um die fraglichen CEPs als solche zu bestätigen, wäre es, die Zellen einerseits zu isolieren und anschliessend ihre Fähigkeit, Blutgefässe zu bilden nachzuweisen. Dies geschieht unter anderem mit Methoden wie immunomagnetischer Isolierung mit anschliessender Kultivierung auf Fibronectin-beschichteten Platten und dem Nachweis der Expression von Oberflächenmarkern wie UEA-1 [134].

In der Veterinärmedizin wurden bisher nur in einer Arbeit zirkulierende endotheliale Zellen direkt im Blut von Hunden durchflusszytometrisch gemessen [136]. In dieser Arbeit wurden

jedoch nur unreife Vorläuferzellen gemessen. Eine andere Studie befasste sich mit der Messung von zirkulierenden Endothelzellen mittels immunomagnetischer Isolierung bei gesunden Hunden [111]. In beiden Arbeiten wurden die absoluten Zellzahlen pro ml angegeben, aber es bleibt unklar, wie diese Zahlen genau erhalten wurden. Unserer Meinung nach sind die in Relation zu den mononukleären Zellen gemessenen Zahlen (CEC bzw. CEP pro 1 Mio. MNZ), welche nicht von der absoluten Zahl mononukleärer Zellen des einzelnen Hundes abhängig sind, verlässlicher als die berechneten absoluten Zahlen pro ml. Dies ergibt sich aus dem Resultat, dass die mononukleären Zellen in unserer Pilotstudie bei gesunden Hunden signifikant höher waren als bei den kranken, was den berechneten Absolutwert in der Kontrollgruppe falsch erhöht.

Vergleicht man trotz des oben genannten Vorbehaltes die bei uns berechneten absoluten Zellzahlen mit denen der beiden anderen veterinärmedizinischen Studien, zeigt sich, dass unsere Werte an CECs deutlich höher sind (1641/ml in unserer Studie versus 43.4/ml in der anderen Studie [111]). Dies könnte, vergleichbar zu humanmedizinischen Studien, an den unterschiedlichen Messmethoden und Zelldefinitionen liegen. Wir haben die Zellen durchflusszytometrisch gemessen, in der anderen Studie wurden sie hingegen immunomagnetisch isoliert. Wie in Kapitel 3.2.1 bereits erwähnt, wurden in der Humanmedizin mittels Durchflusszytometrie jeweils höhere Werte gemessen als mittels immunomagnetischer Isolierung. Im Vergleich mit den Werten für die CEPs der gesunden Hunde in der Studie von Xia et al. sind unsere Werte jedoch deutlich tiefer (632.8/ml bei Xia et al. [136] versus 201/ml in unserer Studie). Dies könnte auf die unterschiedliche Zelldefinition (CD133+/VEGFR-2+ in der Xia et al. Studie versus CD 45-/7-AAD-/CD133+/CD146+ in unserer Studie) zurückzuführen sein.

Bei allen veterinärmedizinischen Studien, unsere mit eingeschlossen, stellt sich die Frage, ob sich die Zelldefinitionen aus der Humanmedizin auf Hundezellen übertragen lassen und ob die verwendeten Antikörper verlässlich mit Hundezellen reagieren. In unserer Studie wurden, abgesehen vom anti-CD45 Antikörper, keine hundespezifischen Antikörper verwendet, doch sollen auch die anti-CD133 und anti-CD146 Antikörper laut Hersteller mit Hundezellen reagieren und wurden in anderen veterinärmedizinischen Studien für die Durchflusszytometrie verwendet [143]. Die Antikörper wurden zudem von uns titriert, um die optimale Konzentration zu ermitteln. Unspezifische Antikörperbindung wurde jeweils durch das Analysieren einer ungefärbten Blutprobe und die Verwendung der Negativkontrollen/Isotypkontrollen bei der Messprotokolletablierung und durch die Beigabe von 20%igem Hundeserum ausgeschlossen. Wir gehen somit davon aus, dass die verwendeten

Antikörper verlässlich mit Hundezellen reagieren und unsere Resultate aussagekräftig sind. Als weitere Bestätigung, dass die verwendeten Antikörper mit Hundezellen reagieren, könnte man sie evt. mit endothelialen Hundezellen oder Hämangiosarkomzellen testen, die bereits charakterisiert sind und beide Oberflächenmarker exprimieren [143].

Wie in verschiedenen humanmedizinischen Studien belegt, sind zirkulierende endotheliale Zellen bei Patienten mit malignen Neoplasien erhöht [9, 10, 73, 91, 106, 107]. Unsere Studie zeigt, dass dies auch bei tumor-erkrankten Hunden der Fall zu sein scheint, zumindest was CECs anbelangt. Obwohl mediane Werte an CEPs bei kranken Hunden höher waren als bei gesunden, war eine statistische Signifikanz nicht nachweisbar. Allerdings handelte es sich insgesamt um eine sehr kleine Gruppengrösse und es ist gut möglich, dass ein Typ II Fehler vorliegt, d.h. mit grösserer Gruppengrösse doch ein wahrer Unterschied darstellbar sein wird. Als nächster Schritt wäre daher eine Messung der CECs und CEPs in einer grösseren Hundepopulation notwendig, welche sowohl gesunde Hunde als auch solche mit Tumorerkrankungen und nicht-tumorösen Krankheiten einschliessen muss. Als weiteren Schritt wäre es für die Veterinär-onkologie von hohem Interesse, zirkulierende endotheliale Zellen als Marker für das Ansprechen auf metronomische Chemotherapie zu evaluieren, was bisher nur in der Humanmedizin bzw. aus Studien an Mausmodellen bekannt ist [9, 10, 68]. Es ist davon auszugehen, dass zirkulierende endotheliale Zellen beim Hund, vergleichbar zu denen beim Menschen [10], durch eine metronomische Chemotherapie beeinflusst werden und als Marker für das Ansprechen auf die Therapie herangezogen werden könnten. Dies wurde beim Hund, wie bereits erwähnt, bisher nicht untersucht.

Trotz den Limitationen scheint das vorgestellte Messprotokoll vielversprechend und es konnte ein Unterschied in den gemessenen CECs zwischen gesunden und kranken Hunden festgestellt werden.

Als Limitationen unserer Studie sind die kleinen Stichprobenpopulationen und das Verwenden von nur wenigen Markern zur Identifizierung zirkulierender endothelialer Zellen zu werten. In Zukunft könnten, wie bereits diskutiert, zusätzliche Marker und die Elektronenmikroskopie zum Nachweis von Weibel-Palade bodies sowie die Fähigkeit zur Blutgefässbildung untersucht werden, um kanine CECs und CEPs besser charakterisieren zu können. Messungen bei grösseren Populationen und bei Patienten unter metronomischer Chemotherapie wären sinnvoll und könnten klinisch relevant und in Folge prospektiv anwendbar sein.

7. Literaturverzeichnis

1. Hanahan, D., G. Bergers, and E. Bergsland, *Less is more, regularly: metronomic dosing of cytotoxic drugs can target tumor angiogenesis in mice*. J Clin Invest, 2000. **105**(8): p. 1045-7.
2. Mutsaers, A.J., *Metronomic chemotherapy*. Top Companion Anim Med, 2009. **24**(3): p. 137-43.
3. Pasquier, E., M. Kavallaris, and N. Andre, *Metronomic chemotherapy: new rationale for new directions*. Nat Rev Clin Oncol, 2010. **7**(8): p. 455-65.
4. Kerbel, R.S. and B.A. Kamen, *The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(6): p. 423-36.
5. Klement, G., et al., *Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity*. J Clin Invest, 2000. **105**(8): p. R15-24.
6. Browder, T., et al., *Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer*. Cancer Res, 2000. **60**(7): p. 1878-86.
7. Mutsaers, A.J., *Chemotherapy: new uses for old drugs*. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 2007. **37**(6): p. 1079-90; vi.
8. Bertolini, F., et al., *The multifaceted circulating endothelial cell in cancer: towards marker and target identification*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(11): p. 835-45.
9. Bertolini, F., et al., *Maximum tolerable dose and low-dose metronomic chemotherapy have opposite effects on the mobilization and viability of circulating endothelial progenitor cells*. Cancer Res, 2003. **63**(15): p. 4342-6.
10. Mancuso, P., et al., *Circulating endothelial-cell kinetics and viability predict survival in breast cancer patients receiving metronomic chemotherapy*. Blood, 2006. **108**(2): p. 452-9.
11. Asahara, T., et al., *VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells*. EMBO J, 1999. **18**(14): p. 3964-72.
12. Hattori, K., et al., *Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells*. J Exp Med, 2001. **193**(9): p. 1005-14.
13. Orimo, A., et al., *Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion*. Cell, 2005. **121**(3): p. 335-48.
14. Asahara, T., et al., *Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis*. Science, 1997. **275**(5302): p. 964-7.
15. Shi, Q., et al., *Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells*. Blood, 1998. **92**(2): p. 362-7.
16. Peichev, M., et al., *Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors*. Blood, 2000. **95**(3): p. 952-8.
17. Lyden, D., et al., *Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth*. Nat Med, 2001. **7**(11): p. 1194-201.
18. Burger, P.E., et al., *Fibroblast growth factor receptor-1 is expressed by endothelial progenitor cells*. Blood, 2002. **100**(10): p. 3527-35.
19. Rosenzweig, A., *Endothelial progenitor cells*. N Engl J Med, 2003. **348**(7): p. 581-2.

20. Bocci, G., K.C. Nicolaou, and R.S. Kerbel, *Protracted low-dose effects on human endothelial cell proliferation and survival in vitro reveal a selective antiangiogenic window for various chemotherapeutic drugs*. Cancer Res, 2002. **62**(23): p. 6938-43.
21. Wang, J., et al., *Paclitaxel at ultra low concentrations inhibits angiogenesis without affecting cellular microtubule assembly*. Anticancer Drugs, 2003. **14**(1): p. 13-9.
22. Emmenegger, U., et al., *A comparative analysis of low-dose metronomic cyclophosphamide reveals absent or low-grade toxicity on tissues highly sensitive to the toxic effects of maximum tolerated dose regimens*. Cancer Res, 2004. **64**(11): p. 3994-4000.
23. Shaked, Y., et al., *Optimal biologic dose of metronomic chemotherapy regimens is associated with maximum antiangiogenic activity*. Blood, 2005. **106**(9): p. 3058-61.
24. Dawson, D.W., et al., *CD36 mediates the In vitro inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells*. J Cell Biol, 1997. **138**(3): p. 707-17.
25. Bocci, G., et al., *Thrombospondin 1, a mediator of the antiangiogenic effects of low-dose metronomic chemotherapy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(22): p. 12917-22.
26. Gupta, K., et al., *Binding and displacement of vascular endothelial growth factor (VEGF) by thrombospondin: effect on human microvascular endothelial cell proliferation and angiogenesis*. Angiogenesis, 1999. **3**(2): p. 147-58.
27. Monestiroli, S., et al., *Kinetics and viability of circulating endothelial cells as surrogate angiogenesis marker in an animal model of human lymphoma*. Cancer Res, 2001. **61**(11): p. 4341-4.
28. de Rezende, L.C., et al., *Regulatory T cell as a target for cancer therapy*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2010. **58**(3): p. 179-90.
29. Ghiringhelli, F., et al., *CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative*. Eur J Immunol, 2004. **34**(2): p. 336-44.
30. Curiel, T.J., et al., *Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival*. Nat Med, 2004. **10**(9): p. 942-9.
31. Ghiringhelli, F., et al., *CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner*. J Exp Med, 2005. **202**(8): p. 1075-85.
32. O'Neill, K., et al., *Changes in regulatory T cells in dogs with cancer and associations with tumor type*. J Vet Intern Med, 2009. **23**(4): p. 875-81.
33. Biller, B.J., et al., *Decreased ratio of CD8+ T cells to regulatory T cells associated with decreased survival in dogs with osteosarcoma*. J Vet Intern Med, 2010. **24**(5): p. 1118-23.
34. Burton, J.H., et al., *Low-dose cyclophosphamide selectively decreases regulatory T cells and inhibits angiogenesis in dogs with soft tissue sarcoma*. J Vet Intern Med, 2011. **25**(4): p. 920-6.
35. Lutsiak, M.E., et al., *Inhibition of CD4(+)25+ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide*. Blood, 2005. **105**(7): p. 2862-8.
36. Emmenegger, U., et al., *Low-dose metronomic daily cyclophosphamide and weekly tirapazamine: a well-tolerated combination regimen with enhanced efficacy that exploits tumor hypoxia*. Cancer Res, 2006. **66**(3): p. 1664-74.
37. Doloff, J.C., et al., *Increased tumor oxygenation and drug uptake during anti-angiogenic weekly low dose cyclophosphamide enhances the anti-tumor effect of weekly tirapazamine*. Curr Cancer Drug Targets, 2009. **9**(6): p. 777-88.

38. Colleoni, M., et al., *Low-dose oral methotrexate and cyclophosphamide in metastatic breast cancer: antitumor activity and correlation with vascular endothelial growth factor levels*. Ann Oncol, 2002. **13**(1): p. 73-80.
39. Colleoni, M., et al., *Metronomic low-dose oral cyclophosphamide and methotrexate plus or minus thalidomide in metastatic breast cancer: antitumor activity and biological effects*. Ann Oncol, 2006. **17**(2): p. 232-8.
40. Andre, N., et al., *Metronomic etoposide/cyclophosphamide/celecoxib regimen given to children and adolescents with refractory cancer: a preliminary monocentric study*. Clin Ther, 2008. **30**(7): p. 1336-40.
41. Kesari, S., et al., *Phase II study of metronomic chemotherapy for recurrent malignant gliomas in adults*. Neuro Oncol, 2007. **9**(3): p. 354-63.
42. Marchetti, V., et al., *First-line metronomic chemotherapy in a metastatic model of spontaneous canine tumours: a pilot study*. Invest New Drugs, 2011.
43. Elmslie, R.E., P. Glawe, and S.W. Dow, *Metronomic therapy with cyclophosphamide and piroxicam effectively delays tumor recurrence in dogs with incompletely resected soft tissue sarcomas*. J Vet Intern Med, 2008. **22**(6): p. 1373-9.
44. Lana, S., et al., *Continuous low-dose oral chemotherapy for adjuvant therapy of splenic hemangiosarcoma in dogs*. J Vet Intern Med, 2007. **21**(4): p. 764-9.
45. Woods, J.P., K.A. Mathews, and A.G. Binnington, *Thalidomide for the treatment of hemangiosarcoma in dogs*. Veterinary and Comparative Oncology, 2004. **2**(2): p. 108-109.
46. Withrow, S.J. and D.M. Vail, *Withrow & MacEwen's small animal clinical oncology*. 4th ed. 2007, St. Louis, Mo.: Saunders Elsevier. xvii, 846 p.
47. Emmenegger, U., et al., *Tumors that acquire resistance to low-dose metronomic cyclophosphamide retain sensitivity to maximum tolerated dose cyclophosphamide*. Neoplasia, 2011. **13**(1): p. 40-8.
48. Montecucco, A. and G. Biamonti, *Cellular response to etoposide treatment*. Cancer Lett, 2007. **252**(1): p. 9-18.
49. Slevin, M.L., et al., *A randomized trial to evaluate the effect of schedule on the activity of etoposide in small-cell lung cancer*. J Clin Oncol, 1989. **7**(9): p. 1333-40.
50. Flory, A.B., et al., *Oral bioavailability of etoposide after administration of a single dose to tumor-bearing dogs*. Am J Vet Res, 2008. **69**(10): p. 1316-22.
51. D'Amato, R.J., et al., *Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(9): p. 4082-5.
52. Farese, J.P., et al., *Effect of thalidomide on growth and metastasis of canine osteosarcoma cells after xenotransplantation in athymic mice*. Am J Vet Res, 2004. **65**(5): p. 659-64.
53. Brown, R.D., et al., *Prognostically significant cytotoxic T cell clones are stimulated after thalidomide therapy in patients with multiple myeloma*. Leuk Lymphoma, 2009. **50**(11): p. 1860-4.
54. Glaspy, J., et al., *Results of a multicenter, randomized, double-blind, dose-evaluating phase 2/3 study of lenalidomide in the treatment of metastatic malignant melanoma*. Cancer, 2009. **115**(22): p. 5228-36.
55. Eisen, T., et al., *Results of a multicenter, randomized, double-blind phase 2/3 study of lenalidomide in the treatment of pretreated relapsed or refractory metastatic malignant melanoma*. Cancer, 2010. **116**(1): p. 146-54.
56. Sleijfer, S., W.H. Kruit, and G. Stoter, *Thalidomide in solid tumours: the resurrection of an old drug*. Eur J Cancer, 2004. **40**(16): p. 2377-82.
57. Khan, K.N., et al., *Expression of cyclooxygenase-2 in canine renal cell carcinoma*. Vet Pathol, 2001. **38**(1): p. 116-9.

58. Dore, M., I. Lanthier, and J. Sirois, *Cyclooxygenase-2 expression in canine mammary tumors*. Vet Pathol, 2003. **40**(2): p. 207-12.
59. McEntee, M.F., J.M. Cates, and N. Neilsen, *Cyclooxygenase-2 expression in spontaneous intestinal neoplasia of domestic dogs*. Vet Pathol, 2002. **39**(4): p. 428-36.
60. Pestili de Almeida, E.M., et al., *Expression of cyclo-oxygenase-2 in naturally occurring squamous cell carcinomas in dogs*. J Histochem Cytochem, 2001. **49**(7): p. 867-75.
61. Dore, M., *Cyclooxygenase-2 expression in animal cancers*. Vet Pathol, 2011. **48**(1): p. 254-65.
62. Sorenmo, K.U., et al., *Evaluation of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 expression and the effect of cyclooxygenase inhibitors in canine prostatic carcinoma*. Vet Comp Oncol, 2004. **2**(1): p. 13-23.
63. Mohammed, S.I., et al., *Effects of the cyclooxygenase inhibitor, piroxicam, in combination with chemotherapy on tumor response, apoptosis, and angiogenesis in a canine model of human invasive urinary bladder cancer*. Mol Cancer Ther, 2003. **2**(2): p. 183-8.
64. Lee, J.Y., et al., *Expression of cyclooxygenase-2, P-glycoprotein and multi-drug resistance-associated protein in canine transitional cell carcinoma*. Res Vet Sci, 2007. **83**(2): p. 210-6.
65. Schmidt, B.R., et al., *Evaluation of piroxicam for the treatment of oral squamous cell carcinoma in dogs*. J Am Vet Med Assoc, 2001. **218**(11): p. 1783-6.
66. Boria, P.A., et al., *Evaluation of cisplatin combined with piroxicam for the treatment of oral malignant melanoma and oral squamous cell carcinoma in dogs*. J Am Vet Med Assoc, 2004. **224**(3): p. 388-94.
67. Man, S., et al., *Antitumor effects in mice of low-dose (metronomic) cyclophosphamide administered continuously through the drinking water*. Cancer Res, 2002. **62**(10): p. 2731-5.
68. Shaked, Y., et al., *Low-dose metronomic combined with intermittent bolus-dose cyclophosphamide is an effective long-term chemotherapy treatment strategy*. Cancer Res, 2005. **65**(16): p. 7045-51.
69. Daenen, L.G., et al., *Low-dose metronomic cyclophosphamide combined with vascular disrupting therapy induces potent antitumor activity in preclinical human tumor xenograft models*. Mol Cancer Ther, 2009. **8**(10): p. 2872-81.
70. Blansfield, J.A., et al., *Combining agents that target the tumor microenvironment improves the efficacy of anticancer therapy*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(1): p. 270-80.
71. Borne, E., et al., *Oral metronomic cyclophosphamide in elderly with metastatic melanoma*. Invest New Drugs, 2010. **28**(5): p. 684-9.
72. Mir, O., et al., *Feasibility of metronomic oral cyclophosphamide plus prednisolone in elderly patients with inoperable or metastatic soft tissue sarcoma*. Eur J Cancer, 2011. **47**(4): p. 515-9.
73. Buckstein, R., et al., *High-Dose celecoxib and metronomic "low-dose" cyclophosphamide is an effective and safe therapy in patients with relapsed and refractory aggressive histology non-Hodgkin's lymphoma*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(17): p. 5190-8.
74. Sung, C.C., et al., *Successful metronomic low-dose cyclophosphamide therapy in an older patient with advanced mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma*. Ann Hematol, 2009. **88**(12): p. 1257-9.
75. Fontana, A., et al., *Clinical and pharmacodynamic evaluation of metronomic cyclophosphamide, celecoxib, and dexamethasone in advanced hormone-refractory prostate cancer*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(15): p. 4954-62.

76. Lord, R., et al., *Low dose metronomic oral cyclophosphamide for hormone resistant prostate cancer: a phase II study*. J Urol, 2007. **177**(6): p. 2136-40; discussion 2140.
77. Glode, L.M., et al., *Metronomic therapy with cyclophosphamide and dexamethasone for prostate carcinoma*. Cancer, 2003. **98**(8): p. 1643-8.
78. Young, S.D., et al., *Phase II clinical trial results involving treatment with low-dose daily oral cyclophosphamide, weekly vinblastine, and rofecoxib in patients with advanced solid tumors*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(10): p. 3092-8.
79. Jurado, J.M., et al., *Combined oral cyclophosphamide and bevacizumab in heavily pre-treated ovarian cancer*. Clin Transl Oncol, 2008. **10**(9): p. 583-6.
80. Krzyzanowska, M.K., et al., *A phase II trial of continuous low-dose oral cyclophosphamide and celecoxib in patients with renal cell carcinoma*. Cancer Chemother Pharmacol, 2007. **60**(1): p. 135-41.
81. Tripp, C.D., et al., *Tolerability of metronomic administration of lomustine in dogs with cancer*. J Vet Intern Med, 2011. **25**(2): p. 278-84.
82. Fossa, A., et al., *Gemcitabine as a single agent in the treatment of relapsed or refractory aggressive non-Hodgkin's lymphoma*. J Clin Oncol, 1999. **17**(12): p. 3786-92.
83. Rizzieri, D.A., et al., *Low-dose weekly paclitaxel for recurrent or refractory aggressive non-Hodgkin lymphoma*. Cancer, 2004. **100**(11): p. 2408-14.
84. Hoshi, A., et al., *Activation of coagulation by a thalidomide-based regimen*. Blood Coagul Fibrinolysis, 2011. **22**(6): p. 532-40.
85. Teo, S.K., et al., *Safety profile of thalidomide after 53 weeks of oral administration in beagle dogs*. Toxicol Sci, 2001. **59**(1): p. 160-8.
86. Teo, S., et al., *Lack of peripheral neuropathy in Beagle dogs after 53 weeks oral administration of thalidomide capsules*. Hum Exp Toxicol, 2000. **19**(11): p. 615-22.
87. Paul, J., J. Belleville, and J. Descotes, *[Circulating endothelial cells in arteriopathies of the lowers limbs]*. Coeur Med Interne, 1974. **13**(2): p. 259-63.
88. Goett, E., *[Occurrence and Significance of Endothelial Cells in the Peripheral Blood]*. Acta Haematol, 1964. **32**: p. 39-43.
89. Wright, H.P. and N.J. Glacometti, *Circulating endothelial cells and arterial endothelial mitosis in anaphylactic shock*. Br J Exp Pathol, 1972. **53**(1): p. 1-4.
90. Patenaude, A., J. Parker, and A. Karsan, *Involvement of endothelial progenitor cells in tumor vascularization*. Microvasc Res, 2010. **79**(3): p. 217-23.
91. Mancuso, P., et al., *Resting and activated endothelial cells are increased in the peripheral blood of cancer patients*. Blood, 2001. **97**(11): p. 3658-61.
92. Mancuso, P., et al., *Validation of a standardized method for enumerating circulating endothelial cells and progenitors: flow cytometry and molecular and ultrastructural analyses*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(1): p. 267-73.
93. Biguzzi, E., et al., *Circulating endothelial cells (CECs) and progenitors (CEPs) in severe haemophiliacs with different clinical phenotype*. Br J Haematol, 2009. **144**(5): p. 803-5.
94. Dubois, S.G., et al., *Circulating endothelial cells and circulating endothelial precursor cells in patients with osteosarcoma*. Pediatr Blood Cancer, 2011.
95. Gritti, G., et al., *Circulating and progenitor endothelial cells are abnormal in patients with different types of von Willebrand disease and correlate with markers of angiogenesis*. Am J Hematol, 2011. **86**(8): p. 650-6.
96. Blann, A.D., et al., *Endothelial progenitor cells and circulating endothelial cells in early prostate cancer: a comparison with plasma vascular markers*. Prostate, 2011. **71**(10): p. 1047-53.
97. Spring, H., et al., *Chemokines direct endothelial progenitors into tumor neovessels*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(50): p. 18111-6.

98. Blann, A.D., et al., *Circulating endothelial cells. Biomarker of vascular disease.* Thromb Haemost, 2005. **93**(2): p. 228-35.
99. George, F., et al., *Rapid isolation of human endothelial cells from whole blood using S-Endo1 monoclonal antibody coupled to immuno-magnetic beads: demonstration of endothelial injury after angioplasty.* Thromb Haemost, 1992. **67**(1): p. 147-53.
100. George, F., et al., *Demonstration of Rickettsia conorii-induced endothelial injury in vivo by measuring circulating endothelial cells, thrombomodulin, and von Willebrand factor in patients with Mediterranean spotted fever.* Blood, 1993. **82**(7): p. 2109-16.
101. Lefevre, P., et al., *Detection of circulating endothelial cells in thrombotic thrombocytopenic purpura.* Thromb Haemost, 1993. **69**(5): p. 522.
102. Camoin-Jau, L., et al., *Circulating endothelial cells in Behcet's disease with cerebral thrombophlebitis.* Thromb Haemost, 2000. **83**(4): p. 631-2.
103. Woywodt, A., et al., *Isolation and enumeration of circulating endothelial cells by immunomagnetic isolation: proposal of a definition and a consensus protocol.* J Thromb Haemost, 2006. **4**(3): p. 671-7.
104. Woywodt, A., et al., *Elevated numbers of circulating endothelial cells in renal transplant recipients.* Transplantation, 2003. **76**(1): p. 1-4.
105. Nakatani, K., et al., *Circulating endothelial cells in Kawasaki disease.* Clin Exp Immunol, 2003. **131**(3): p. 536-40.
106. Jacques, N., et al., *Quantification of circulating mature endothelial cells using a whole blood four-color flow cytometric assay.* J Immunol Methods, 2008. **337**(2): p. 132-43.
107. Bertolini, F., et al., *The multiple personality disorder phenotype(s) of circulating endothelial cells in cancer.* Biochim Biophys Acta, 2009. **1796**(1): p. 27-32.
108. Beerepoot, L.V., et al., *Increased levels of viable circulating endothelial cells are an indicator of progressive disease in cancer patients.* Ann Oncol, 2004. **15**(1): p. 139-45.
109. Goon, P.K., et al., *Detection and quantification of mature circulating endothelial cells using flow cytometry and immunomagnetic beads: a methodological comparison.* Thromb Haemost, 2006. **96**(1): p. 45-52.
110. Case, J., et al., *Human CD34+AC133+VEGFR-2+ cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors.* Exp Hematol, 2007. **35**(7): p. 1109-18.
111. Wills, T.B., et al., *Immunomagnetic isolation of canine circulating endothelial and endothelial progenitor cells.* Vet Clin Pathol, 2009. **38**(4): p. 437-42.
112. Garcia-Barros, M., et al., *Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis.* Science, 2003. **300**(5622): p. 1155-9.
113. Peters, B.A., et al., *Contribution of bone marrow-derived endothelial cells to human tumor vasculature.* Nat Med, 2005. **11**(3): p. 261-2.
114. Stoll, B.R., et al., *A mathematical model of the contribution of endothelial progenitor cells to angiogenesis in tumors: implications for antiangiogenic therapy.* Blood, 2003. **102**(7): p. 2555-61.
115. Duda, D.G., et al., *Evidence for incorporation of bone marrow-derived endothelial cells into perfused blood vessels in tumors.* Blood, 2006. **107**(7): p. 2774-6.
116. Ruzinova, M.B., et al., *Effect of angiogenesis inhibition by Id loss and the contribution of bone-marrow-derived endothelial cells in spontaneous murine tumors.* Cancer Cell, 2003. **4**(4): p. 277-89.
117. Gao, D., et al., *Bone marrow-derived endothelial progenitor cells contribute to the angiogenic switch in tumor growth and metastatic progression.* Biochim Biophys Acta, 2009. **1796**(1): p. 33-40.
118. Gaynor, E., C.A. Bouvier, and J.R. Cintron, *A technique for locating rare cells in the circulation for ultramicroscopy.* Proc Soc Exp Biol Med, 1970. **133**(2): p. 520-3.

119. Dignat-George, F. and J. Sampol, *Circulating endothelial cells in vascular disorders: new insights into an old concept*. Eur J Haematol, 2000. **65**(4): p. 215-20.
120. Solovey, A.N., et al., *Identification and functional assessment of endothelial PIH12*. J Lab Clin Med, 2001. **138**(5): p. 322-31.
121. Elshal, M.F., et al., *CD146 (Mel-CAM), an adhesion marker of endothelial cells, is a novel marker of lymphocyte subset activation in normal peripheral blood*. Blood, 2005. **106**(8): p. 2923-4.
122. Duda, D.G., et al., *Differential CD146 expression on circulating versus tissue endothelial cells in rectal cancer patients: implications for circulating endothelial and progenitor cells as biomarkers for antiangiogenic therapy*. J Clin Oncol, 2006. **24**(9): p. 1449-53.
123. Kim, I., O.H. Yilmaz, and S.J. Morrison, *CD144 (VE-cadherin) is transiently expressed by fetal liver hematopoietic stem cells*. Blood, 2005. **106**(3): p. 903-5.
124. Masouleh, B.K., et al., *Quantification of circulating endothelial progenitor cells in human peripheral blood: establishing a reliable flow cytometry protocol*. J Immunol Methods, 2010. **357**(1-2): p. 38-42.
125. Matsusaka, S., et al., *Circulating endothelial progenitors and CXCR4-positive circulating endothelial cells are predictive markers for bevacizumab*. Cancer, 2011. **117**(17): p. 4026-32.
126. Malka, D., et al., *Clinical value of circulating endothelial cell levels in metastatic colorectal cancer patients treated with first-line chemotherapy and bevacizumab*. Ann Oncol, 2011.
127. Ali, A.M., et al., *Determining circulating endothelial cells using CellSearch system during preoperative systemic chemotherapy in breast cancer patients*. Eur J Cancer, 2011.
128. Strijbos, M.H., et al., *Cells meeting our immunophenotypic criteria of endothelial cells are large platelets*. Cytometry B Clin Cytom, 2007. **72**(2): p. 86-93.
129. Rafii, S., et al., *Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy?* Nat Rev Cancer, 2002. **2**(11): p. 826-35.
130. Pelosi, E., et al., *Identification of the hemangioblast in postnatal life*. Blood, 2002. **100**(9): p. 3203-8.
131. Bailey, A.S., et al., *Transplanted adult hematopoietic stems cells differentiate into functional endothelial cells*. Blood, 2004. **103**(1): p. 13-9.
132. Mund, J.A. and J. Case, *The ontogeny of endothelial progenitor cells through flow cytometry*. Curr Opin Hematol, 2011. **18**(3): p. 166-70.
133. Estes, M.L., et al., *Identification of endothelial cells and progenitor cell subsets in human peripheral blood*. Curr Protoc Cytom, 2010. **Chapter 9**: p. Unit 9 33 1-11.
134. Richardson, M.R. and M.C. Yoder, *Endothelial progenitor cells: quo vadis?* J Mol Cell Cardiol, 2011. **50**(2): p. 266-72.
135. Wu, H., et al., *Differentiation and proliferation of endothelial progenitor cells from canine peripheral blood mononuclear cells*. J Surg Res, 2005. **126**(2): p. 193-8.
136. Xia, L., et al., *Senescent endothelial progenitor cells from dogs with pulmonary arterial hypertension: a before-after self-controlled study*. J Physiol Sci, 2009. **59**(6): p. 429-37.
137. VCOG, Veterinary Co-operative Oncology Group - *Common Terminology Criteria for Adverse Events (VCOG-CTCAE) following chemotherapy or biological antineoplastic therapy in dogs and cats v1.0*. Vet Comp Oncol, 2004. **2**(4): p. 195-213.
138. Therasse, P., et al., *New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors*. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National

- Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. J Natl Cancer Inst, 2000. 92(3): p. 205-16.*
139. Leach, T.N., et al., *Prospective trial of metronomic chlorambucil chemotherapy in dogs with naturally occurring cancer. Veterinary and Comparative Oncology, 2011: p. no-no.*
 140. Harirforoosh, S. and F. Jamali, *Renal adverse effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Expert Opin Drug Saf, 2009. 8(6): p. 669-81.*
 141. Black, H.E., *Renal toxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs. Toxicol Pathol, 1986. 14(1): p. 83-90.*
 142. Prokopi, M., et al., *Proteomic analysis reveals presence of platelet microparticles in endothelial progenitor cell cultures. Blood, 2009. 114(3): p. 723-32.*
 143. Lamerato-Kozicki, A.R., et al., *Canine hemangiosarcoma originates from hematopoietic precursors with potential for endothelial differentiation. Exp Hematol, 2006. 34(7): p. 870-8.*

8. Anhang

Anhang 1: Studien zur metronomischen Chemotherapie:

Präklinisch:

Patientenpopulation	metronomisches Protokoll	Ansprechen
Mausmodelle für Prostatakrebs, Colonkrebs, Melanom, Brustkrebs [67]	10, 20, 25 oder 40mg/kg Cyclophosphamid kontinuierlich über das Trinkwasser	Verlangsamung des Tumorwachstums bis annähernde Tumorregression
Mausmodelle für Prostatakrebs, Brustkrebs und murine Erythroleukämie [68]	20mg/kg täglich über das Trinkwasser 150mg/kg Cyclophosphamid i.p. alle 3 Wochen	Verlangsamung des Tumorwachstums und Hemmung/Hinauszögern der Tumorprogression Massive Lebensverlängerung
Mausmodell für resistentes Lewis Lungenkarzinom und Mammakarzinom [6]	170mg/kg Cyclophosphamid alle 6 Tage	Kein Tumorwachstum für 36 Tage, Gewichtsverlust von weniger als 5%, nach 36 Tagen langsames Tumorwachstum (Mäuse mit konventioneller Behandlung mit 450mg/kg Cyclophosphamid alle 21 Tage zeigten nach 13 Tagen massives Tumorwachstum und verloren 21% des Körpergewichtes)
Mausmodell für aggressiven Brustkrebs [69]	Gruppe 1: 20mg/kg Cyclophosphamid täglich über das Trinkwasser Gruppe 2: 20mg/kg Cyclophosphamid täglich über das Trinkwasser; 50mg/kg OXi4503 i.p. alle 2 Wochen Gruppe 3: 50mg/kg OXi4503 i.p. alle 2 Wochen Kontrollgruppe: keine Therapie	Gruppe 1: mässige Tumorwachstumshemmung (small delay of tumor growth) Gruppe 2: massive Tumorwachstumshemmung, lange Tumorkontrolle Gruppe 3: beachtliche Tumorwachstumshemmung, aber innerhalb 4 Wochen erneutes Tumorwachstum
Mausmodell für Kolon- und Pankreaskrebs, oculäres - und kutanes Melanom [70]	Gruppe 1: 40mg/kg Sunitinib täglich Gruppe 2: 100mg/kg Lenalidomid täglich Gruppe 3: 25mg/kg Cyclophosphamid täglich Gruppe 4: Kombination von Sunitinib und Lenalidomid Gruppe 5: Triple Therapie Gruppe 6: Kontrollgruppe	Oculäres Melanom: Signifikante Hemmung des Tumorwachstums durch die einzelnen Medikamente Bei Kombinationsanwendung (triple Therapie) fast komplette Unterdrückung des Tumorwachstums Für die anderen Tumormodelle sind die Resultate vergleichbar

OXi4503 = vascular microtubule disrupting agent

Klinisch:

Patientenpopulation	metronomisches Protokoll	Anzahl Patienten	Ansprechen auf Therapie
Nicht-resezierbare metastatische Melanome bei älteren Patienten [71]	50mg Cyclophosphamid 1x täglich p.o.(für 3 von 4 Wochen) Anschließend 100mg Cyclophosphamid 1x täglich p.o. (für 3 von 4 Wochen)	13	PR: 1 SD: 5 (mittlere Dauer 10 Mo) PD: 5 OS (stage III): 6-36 Mo OS (stage IV): 4-24 Mo
Inoperable oder metastasierte Weichteilsarkome bei älteren Patienten [72]	100mg Cyclophosphamid p.o. 2x täglich 20mg prednisolon p.o. 1x täglich	26	CR: 1 PR: 6 SD (≥ 12 Wo): 11 PFS: 6.8 Mo (0-20.6) OS: 14.1 Mo (1.2-30.4)
Verschiedene refraktäre Tumoren bei Kindern und Jugendlichen [40]	25mg/m ² Etoposid 1x täglich (Tag 1-14) 25mg/m ² Cyclophosphamid 1x täglich (Tag 15-28) 100-400mg Celecoxib 1x täglich (Tag 1-28)	17	SD (>20 Wo): 7 SD (<20 Wo): 2 CR: 2 PD: 5
Rezidierte und resistente Non-Hodgkin's Lymphome [73]	Celecoxib 400mg p.o. 2x täglich Cyclophosphamid 50mg p.o. 1x täglich	35	CCR: 2 SD: 22% OS (median): 14.4 Mo PFS (median): 4.7 Mo
Mucosa-assoziiertes (lymphoid tissue) Lymphom [74]	50mg Cyclophosphamid p.o. 1x täglich 10mg Prednisolon p.o. 1x täglich	1	Nach einem Jahr beinahe CR Verschwinden der klinischen Symptome
Metastasierte Mammakarzinome [10]	2.5mg Methotrexate p.o. 2x täglich an Tag 1 und 4 jeder Woche und 50mg Cyclophosphamid p.o. 1x täglich Ein Teil der Patientinnen erhielt zusätzlich 200mg Thalidomid p.o. täglich	171	CR: 6 PR: 22 Clinical benefit (CR+PR+SD > 24 Wo): 41.5%
Metastasierte Mammakarzinome [38]	2.5mg Methotrexate p.o. 2x täglich an Tag 1 und 2 jeder Woche oder an Tag 1 und 4 50mg Cyclophosphamid p.o. 1x täglich	63	CR: 2 PR: 12 SD: 8 TTP: 2.8 Mo (95% CI 2.1-5.9)
Fortgeschrittener hormonresistenter Prostatakrebs [75]	500mg/m ² Cyclophosphamidbolus i.v. (Tag 1) 50mg Cyclophosphamid p.o. 1x täglich (ab Tag 2) 200mg Celecoxib p.o. 2x täglich 1mg Dexamethason p.o. 1x täglich	28	PFS: 3 Mo (95% CI, 2.2-4.2 Mo) OS: 21 Mo (95% CI, 12.4-29.4 Mo)
Hormonresistenter Prostatakrebs [76]	50mg/m ² Cyclophosphamid p.o. kontinuierlich in 4-Wochen-Zyklen ohne Unterbruch, total 12 Zyklen	58	RR: 34.5% PR: 1 Median duration of response: 7.5 Mo (3-18)
Prostatakarzinome [77]	50mg Cyclophosphamid 1x täglich (morgens) 1mg Dexamethason 1x täglich (abends)	34	$\geq 80\%$ Reduktion in PSA: 29% 50-79% Reduktion in PSA: 39% $< 50\%$ Reduktion in PSA: 6% PD: 26%
Fortgeschrittene solide Tumoren [78]	50mg Cyclophosphamid p.o. 1x täglich 25mg Rofecoxib 1x täglich 3mg/m ² Vinblastin i.v. 1x wöchentlich 100mg Minocycline p.o. 2x täglich (für	47	CR: 2 PR: 4 SD (≥ 6 Mo): 8 PFS: 103 Tage (289 Tage für

	50% der Patienten)		Patienten mit klinischem Benefit) OS: 253 Tage (375 Tage für Patienten mit klinischem Benefit)
Vorbehandelter Ovarkrebs [79]	50mg Cyclophosphamid p.o. 1x täglich 10mg/kg Bevacizumab i.v. alle 2 Wochen	9	CR: 2 PR: 2 SD (>12 Wo): 2 PD: 3 Mean OS: 53 Mo (47-61)
Rezidierte maligne Gliome [41]	50mg/m ² Etoposid 1x täglich für 3 Wochen, im Wechsel mit 2mg/kg Cyclophosphamid 1x täglich für 3 Wochen 50-200mg Thalidomid 1x täglich 200mg Celecoxib 2x täglich	48	PR: 2% SD: 59% PD: 30% Median PFS (GBM): 11 Wo Median OS (GBM): 21 Wo Median PFS (AG): 14 Wo Median OS (AG): 41.5 Wo
Fortgeschrittene oder metastasierte renale Karzinome [80]	50mg Cyclophosphamid 1x täglich 400mg Celecoxib 2x täglich	32	PR: 1 SD (>6 Mo): 3 Median PFS: 3.5 Mo (1.9-4.1) Median OS: 14.5 Mo (8.4-20.8)

Abkürzungen: CR complete response; PR partial response; SD stable disease; PD progressive disease; CCR Complete clinical response; RR response rate; PFS progression free survival; TTP time to progression; OS overall survival; CI Confidence Interval; PSA prostate specific antigen; GBM glioblastoma multiforme; AG anaplastic glioma

Anhang 2: Fragebogen Besitzer:

Lebensqualität Patienten metronomische Chemo

Datum					
Mein Hund freut sich, wenn ich nach Hause komme: ► immer/meistens: ► oft: ► kaum/nie:					
Mein Hund steht auf, um mich zu begrüßen, wenn ich nach Hause komme: ► immer/meistens: ► oft: ► kaum/nie:					
Mein Hund rennt im Haus umher und spielt: ► immer/meistens: ► oft: ► kaum/nie:					

Mein Hund schläft ruhig: ► immer/meistens: ► oft: ► kaum/nie:					
Mein Hund putzt, kratzt, schüttelt sich normal: ► immer/meistens: ► oft: ► kaum/nie:					
Mein Hund hat einen normalen Appetit: ► immer/meistens: ► oft: ► kaum/nie:					
Mein Hund hat einen normalen Durst/trinkt normal viel: ► immer/meistens: ► oft: ► kaum/nie:					
Mein Hund zeigt einen normalen Harn-und Kotabsatz: ► immer/meistens: ► oft: ► kaum/nie:					
Mein Hund lässt mich den Tumor berühren: ► immer/meistens: ► oft: ► kaum/nie:					
Ich glaube mein Hund ist zufrieden: ► immer/meistens: ► oft: ► kaum/nie:					

Bei der Medikamentengabe gibt es Probleme/Schwierigkeiten: ► immer/meistens: ► oft: ► kaum/nie:					
Die Medikamentendosis wurde seit der letzten Kontrolle geändert: ► ja ► nein					
Gründe für die Dosisänderung: ► Nebenwirkungen: ► finanzielle Gründe: ► sonstige:					
Mein Hund zeigt Nebenwirkungen: ► ja ► nein					
Art der Nebenwirkungen: ► EB: ► DF: ► Harnabsatzprobleme: ► Müdigkeit/Zittern: ► sonstige:					
Die Therapiekosten sind gut tragbar: ► ja: ► nein: ► einigermaßen:					
Lebensqualität: ► gut: ► mässig: ► schlecht:					

Anhang 3: Gradeinteilung Nebenwirkungen:

Hämatokrit (%):

0=Normalbereich
1=>30%-untere Grenze
2=25-30%
3=20-25%
4=<20%

Thrombozyten (/µl):

0=Normalbereich
1=>100 000 - untere Grenze
2=50 000-99 000
3=25 000-49 000
4=<25 000

Neutrophile (/µl):

0=Normalbereich
1=>1500-untere Grenze
2=1000-1499
3=500-999
4=<500

Erbrechen:

0=kein EB
1=<3x in 24h
2=3-5x in 24h, <3x in 24h für >2d;<5d iv/sc Flüssigkeit<24h
3=>5x in 24h, >4d, iv Flüssig. >24h, TPN

Durchfall:

0=kein DF
1=>2x über normal
2=2-6x über normal, iv/sc Flüssigkeit<24h
3=>6x über normal, Inkontinenz, iv Flüssig. >24h 4=lebensgefährlich

Anorexie:

0=frisst normal
1=muss animiert werden, Diätwechsel
2=<3d, ohne Gewichtsverlust
3=3-5d mit Gewichtsverlust, Therapie indiziert

9. Danksagung und Widmung

Ich danke herzlich:

Dr. Natalie Hofer-Inteeworn für die Betreuung der Arbeit

PD Dr. Carla Rohrer Bley für die Betreuung der Arbeit und die Übernahme des Referats

Prof. Dr. Johannes Vogel für die Übernahme des Korreferats

Dr. Marina Meli, Enikő Gönczi und Beatrice Weibel für die Hilfe bei labortechnischen Fragen

Ms. Anette Schütz und Dr. Malgorzata Kisielow für die Hilfe bei den durchflusszytometrischen Untersuchungen und der Etablierung des Messprotokolles

Dr. Francesco Bertolini und Dr. Patrizia Mancuso für ihre Hilfe bei der Entwicklung des Protokolles für die Messung der zirkulierenden endothelialen Zellen

Dr. Sonja Hartnack für die Hilfe bei der Statistik

Der Abteilung Radio-Onkologie und der Klinik für Kleintiermedizin für die Bereitstellung und Betreuung der Fälle

Allen Besitzern und ihren Hunden für die Teilnahme an der Studie und die Einwilligung zur Blutentnahme für die Durchflusszytometrie

Meiner Schwester, meinen Freunden und meiner Verwandtschaft für die Unterstützung und die Aufmunterungen in „Krisenzeiten“

Meinen Eltern sei an dieser Stelle nicht nur von Herzen gedankt für ihre grenzenlose und immerwährende Unterstützung in allen Lebenslagen, sondern die vorliegende Arbeit auch in Dankbarkeit gewidmet.

10. Lebenslauf

Name	Sabina Tamara Bondolfi
Geburtsdatum	11. Mai 1980
Geburtsort	Zürich
Nationalität	Schweizerin
Heimatort	Poschiavo, GR
1987-1999	Rudolf-Steiner-Schule Zürich
1999-2002	Minerva-Gymnasium Zürich
2003-2009	Studium der Veterinärmedizin an der Vetsuisse-Fakultät der Universität Zürich
2009	Staatsexamen an der Vetsuisse-Fakultät der Universität Zürich
2010-2012	Doktorat an der Abteilung für Radio-Onkologie, Vetsuisse-Fakultät, Universität Zürich